

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-*PERFRINGENS* A, ANTI-VIBRION SEPTIQUE, ANTI-HISTOLYTIQUE ET ANTI-ŒDEMATIENS PRÉPARATION, TITRAGE ET PROPRIÉTÉS DES TOXINES CORRESPONDANTES

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

### CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TOXINE DU *B. PERFRINGENS* A TOXINOGENÈSE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX

par MAYLIS GUILLAUMIE.

(*Institut Pasteur.*)

#### I. — Action hémolytique de la toxine *perfringens*.

##### A. — TOXINE LIQUIDE.

Nous avons déterminé l'effet hémolytique, sur les hématies de mouton, de la toxine *perfringens* obtenue par centrifugation des cultures de vingt-deux heures préparées à 30° ou 33° dans du bouillon Vf ordinaire ou dans du bouillon Vf additionné soit de 1 gramme par litre de sang desséché, soit de quantités variables de peptones diverses, soit de cystéine.

Pour préciser la dose minima hémolytique (D. M. H.) nous

procédons ainsi : dans une série de tubes contenant des volumes décroissants de culture centrifugée, convenablement diluée, nous mettons 0 c. c. 1 d'une suspension de globules rouges (1) à 5 p. 100 et de l'eau physiologique pour amener à 1 cent. cube le volume de tous les mélanges. Nous plaçons les tubes dans une étuve à 37°, pendant quatre heures, puis nous les laissons à la température du laboratoire jusqu'au lendemain. Nous notons alors la plus petite quantité de toxine qui a déterminé l'hémolyse totale des globules employés.

a) DOSE MINIMA HÉMOLYTIQUE DE LA TOXINE PRÉPARÉE DANS DU BOUILLON VF ADDITIONNÉ OU NON DE SUBSTANCES COMPLEXES. — Voici les résultats que nous avons obtenus avec M<sup>lle</sup> Fabre et M<sup>lle</sup> Charles en déterminant, au cours de trois expériences, les valeurs de la dose minima hémolytique (D. M. H.) des toxines *perfringens* préparées comparativement dans des bouillons Vf additionnés ou non de peptones commerciales.

NATURE DU BOUILLON	D. M. H. des cultures centrifugées (en centimètre cube)		
	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Bouillon Vf ordinaire . . . . .	0,001	0,0003	0,0004
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de peptone Chapoteaut.	0,0007		
Bouillon Vf + 5 p. 1.000 de peptone Chapoteaut.	0,0006		
Bouillon Vf + 10 p. 1.000 de peptone Chapoteaut.	0,0008		
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de pept. Vaillant PBC.	0,0006		0,0005
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de peptone Defresne. .		0,0004	0,0009
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de peptone Witte. . .		0,0004	0,0008

Les chiffres notés pendant ces trois expériences indiquent que le *B. perfringens* élabore dans le bouillon Vf et dans le bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de peptone Chapoteaut, Vaillant, Defresne ou Witte, des quantités comparables d'hémolysines (2) ; la dose minima hémolytique des toxines titrées aussitôt après la centrifugation a été comprise entre 0 c. c. 0003 et 0 c. c. 001.

(1) Les globules utilisés (globules frais de mouton) ont été lavés à l'eau physiologique. Au cours de toutes les déterminations de la D. M. H. nous avons fait usage de tubes très soigneusement lavés, rincés à l'eau distillée, puis stérilisés ; toutes les pipettes de précision ont été lavées à l'alcool avant de les stériliser et tous les titrages ont été faits en double.

(2) SVARTZ (Nanna) et BRODD ont signalé que le *B. perfringens* émet



Dans une autre série d'expériences, au cours desquelles nous avons recherché, sur les conseils de M. G. Ramon, si la toxicité des cultures préparées dans du bouillon additionné de sang desséché de cheval est plus élevée que celle des cultures réalisées en bouillon ordinaire, nous avons comparé l'effet hémolytique des toxines obtenues en présence et en l'absence de cette substance ; rappelons que dans les essais de Walbum et Reymann le sang défibriné de cheval n'augmente pas la production de la toxine *perfringens* (titrages sur souris). Dans les nôtres, nous avons constaté, en évaluant la dose minima mortelle et la dose minima hémolytique des différentes toxines centrifugées vingt-deux heures après l'ensemencement des bouillons, que les cultures préparées dans les bouillons Vf additionnés, par litre, de 1 gramme à 4 gr. 5 de sang desséché de cheval sont, dans 7 cas sur 8, plus toxiques pour la souris que les cultures faites parallèlement en bouillon Vf ordinaire (titrages par voie veineuse) et qu'elles manifestent, vis-à-vis des globules de mouton, sensiblement la même activité hémolytique que ces dernières.

b) DOSE MINIMA HÉMOLYTIQUE DE LA TOXINE PRÉPARÉE DANS DU BOUILLON Vf ADDITIONNÉ DE CYSTÉINE. — En mesurant les fluctuations de l'activité hémolytique des différentes cultures de *B. perfringens*, Orr et Reed (3) ont précisé que la cystéine — facteur qui exerce une action marquée sur le potentiel d'oxydo-réduction durant la période de développement actif du bacille *perfringens* A — affecte considérablement l'élaboration de l'hémotoxine *perfringens* : l'addition de 0,1 p. 100 ou plus de cystéine dans le bouillon de Robertson inhibe, dans leurs essais, la production de l'hémotoxine. La cystine exerce un effet analogue. Orr et Reed ont constaté que l'agent hémoly-

peu d'hémolysine dans du bouillon contenant des fragments de foie (*Acta Med. Scand.*, 75, 1931, p. 450). NAGLER a confirmé ce fait. Dans nos recherches nous évitons l'emploi des substances qui inhibent l'apparition de l'une des propriétés de la toxine *perfringens* et qui, par là-même, diminuent sa valeur antigène. Dans le but d'obtenir des sérums anti-*perfringens* à effets multiples, il convient d'employer, pour l'immunisation, des toxines présentant le maximum de complexité.

(3) ORR (J. H.) et REED (G. B.). *Canadian J. Research*, 11, 1934, p. 622.

tique n'apparaît qu'en petite quantité dans les bouillons riches en cystine (milieux aux muscles de poisson) alors qu'au contraire, dans les bouillons pauvres en cystine (bouillons aux muscles de bœuf), la toxine formée est très hémolytique.

Au cours de ces recherches les auteurs n'ont pas déterminé parallèlement la toxicité des différentes cultures examinées. L'étude simultanée de la toxicité et de l'activité hémolytique est cependant particulièrement intéressante car, d'après Locke et Main (4) la cystéine agirait différemment sur la formation des neurotoxines en général et des hémotoxines : elle inhiberait l'élaboration des premières et n'affecterait pas la genèse des deuxièmes. D'après leurs recherches, en effet, la cystéine, ajoutée à des bouillons de viande immédiatement avant de les ensemer avec des *B. diphtériques*, tétaniques ou *perfringens*, empêcherait la production des neurotoxines diphtérique et tétanique et, contrairement aux résultats de Orr et Reed, n'influencerait pas la formation de l'hémotoxine *perfringens* ; elle ne jouerait pas non plus de rôle sur l'hémolysine tétanique. Par contre, l'ion  $\text{Fe}^{++}$  stimulerait la production de l'hémolysine *perfringens* dans les essais de Locke et Main, l'ion cuivrique diminuerait le titre hémolytique des filtrats stériles d'hémotoxine *perfringens*. Après avoir rapproché ces constatations de celles qu'ils ont faites au cours de leurs études sur le rôle du fer, du cuivre, de la cystéine, du cyanure de sodium, etc., dans la formation des toxines diphtérique et tétanique, ils ont formulé une conception sur la constitution des neurotoxines et des hémotoxines. Locke et Main, cependant, n'ont pas signalé de résultats numériques sur la toxicité des cultures de *B. perfringens* qu'ils ont obtenues dans ces recherches, leurs préparations n'ayant pas présenté une valeur suffisante à ce point de vue. Etant donné que notre souche de *B. perfringens* nous permet de préparer de bonnes toxines, nous avons effectué quelques expériences avec M<sup>me</sup> Guélin et M<sup>lle</sup> Fabre pour nous faire une opinion sur l'influence que la cystéine exerce simultanément sur le taux des cultures en hémolysine et en toxine *perfringens*.

Dans une série de tubes contenant 8 cent. cubes de

(4) LOCKE (Arthur) et MAIN (E. R.). *J. infect. Dis.*, 48, 1931, p. 419.



bouillon Vf stérile, glucosé à 1 p. 1.000 et privé d'air par un chauffage à 100°, nous avons ajouté 0,25, 0,5, 0,8, 1 p. 100 de chlorhydrate de cystéine (5). Les tubes, scellés immédiatement après l'ensemencement, ont été placés dans un thermostat à 33°. Au bout de dix-huit heures d'étuve, nous avons centrifugé les cultures, puis déterminé la dose minima mortelle et la dose minima hémolytique du liquide centrifugé. Comme dans les expériences antérieures, nous considérons comme dose minima hémolytique la plus petite quantité de toxine centrifugée qui hémolyse totalement ou presque totalement 0 c. c. 1 de globules de mouton à 5 p. 100.

Dans le tableau VIII, où sont groupés les résultats de quatre expériences, nous indiquons la toxicité et le pH des cultures centrifugées après dix-huit heures d'étuve à 33°, ainsi que la valeur de leur dose minima hémolytique. Nous exprimons, comme toujours, la toxicité des cultures centrifugées par le nombre de doses minima mortelles (D. M. M.) qu'elles contiennent par centimètre cube. L'ensemble de nos chiffres indique que la *cystéine, ajoutée au bouillon Vf aux doses de 0,25 à 1 p. 100 ne provoque pas*, dans les conditions de nos expériences, *de variations significatives dans la genèse des facteurs toxiques et hémolytiques des cultures de B. perfringens*. Voici, en effet, les résultats des expériences II et III.

## EXPÉRIENCE II :

	D. M. M. par centimètre cube
Toxicité des cultures en bouillon Vf . . . . .	30
Toxicité des cultures en bouillon Vf + 0,5 p. 100 de cystéine.	35
Toxicité des cultures en bouillon Vf + 0,8 p. 100 de cystéine.	30 à 35
Toxicité des cultures en bouillon Vf + 1 p. 100 de cystéine.	30 à 35

La valeur de la dose minima hémolytique des mêmes cultures centrifugées est, respectivement, de 0,003-0,005-0,003-0,004 cent. cubes.

(5) Nous avons utilisé une solution à 5 p. 100 que nous avons préparée, neutralisée, puis filtrée sur bougie juste au moment de la répartir dans les tubes contenant 8 cent. cubes de bouillon Vf stérile. Le volume a été amené à 10 cent. cubes avec de l'eau physiologique dans les tubes témoins (bouillon Vf non additionné de cystéine) et dans les tubes contenant des quantités décroissantes de cystéine. Le pH des mélanges, avant l'ensemencement, a varié entre 7,55 et 7,6.

## EXPÉRIENCE III :

Toxicité des cultures en bouillon Vf : 20 à 25 D.M. par centimètre cube.

Toxicité des cultures en bouillon Vf + 0,5 p. 100, 0,8 ou 1 p. 100 de cystéine :  
20 D.M. par centimètre cube.

D.M.H. de ces cultures : 0 c.c. 001, 0 c.c. 001, 0 c.c. 002, 0 c.c. 001.

TABLEAU VIII. — Toxicité et dose minima hémolytique (D.M.H.), après centrifugation, des cultures de *B. perfringens* A effectuées dans du bouillon Vf additionné ou non de cystéine.

NUMÉROS des expériences	NATURE de la détermination (après culture)	QUANTITÉ DE CYSTÉINE AJOUTÉE AU BOUILLON Vf				
		0	0,25 p. 100	0,5 p. 100	0,8 p. 100	1 p. 100
I . . . . .	pH	6,6	6,85	6,9-7	7,05	
	Toxicité.	30	30-35		20-25	
	D.M.H.	0,003	0,002	0,003	0,002	
II . . . . .	pH	6,9		6,85	6,9	6,9
	Toxicité.	30		33	30-35	30-35
	D.M.H.	0,003		0,005	0,003	0,0004
III . . . . .	pH	6,6		6,7	6,7	6,8
	Toxicité.	20-25		20	20	20
	D.M.H.	0,004		0,004	0,002	0,001
IV . . . . .	pH	6,9-7		6,8-6,9	6,8-6,9	6,8-6,9
	Toxicité.	20		20	25	20-25
	D.M.H.	0,0004		0,0004	0,0005	0,0005

Dans un autre groupe de recherches nous avons observé les faits suivants avec M. Fabre et G. Charles :

1° La cystéine, aux doses de 0,6 à 1 p. 1.000, n'augmente ni ne diminue la valeur hémolytique de la toxine *perfringens* fraîchement préparée dans du bouillon Vf ;

2° La toxine *perfringens* liquide, conservée à 2° ou à 37°, en tubes scellés sous le vide, peut perdre 65 à 90 p. 100 de son pouvoir hémolytique en quinze à trente jours ; la cystéine, aux doses ci-dessus, rétablit généralement l'activité hémolytique initiale.

Avec M. Fabre nous avons constaté ceci : 1° la toxicité de la toxine *perfringens* liquide, conservée à 2° dans des tubes bouchés au coton, diminue plus lentement que l'activité hémolytique ; 2° ajoutée à la dose de 1 p. 1.000 à 5 échantillons de toxine qui ont perdu dans ces conditions 99 p. 100 de leur activité hémolytique et seulement 50 à 70 p. 100 de leur toxicité, la cystéine restaure totalement l'effet hémolytique des 5 toxines ; elle atténue la toxicité de l'une, ne modifie pas sensiblement celle d'une autre et, par contre, augmente légèrement celle de 2 toxines et nettement celle de la dernière.



B. — TOXINE *PERFRINGENS* PRÉCIPITÉE  
PAR LE SULFATE NEUTRE D'AMMONIUM.

Maints auteurs ont noté que le rapport entre l'effet toxique et l'effet hémolytique des toxines *perfringens* liquides présente des valeurs qui varient d'une expérience à l'autre. Pour nous rendre compte si les proportions relatives des actions toxiques et hémolytiques de nos échantillons de toxine précipitée variaient aussi, nous avons récemment comparé les valeurs de la dose minima mortelle et de la dose minima hémolytique de 9 échantillons. Nous avons utilisé, au cours de ces recherches, des échantillons dont nous avons déjà établi, par la méthode des injections intraveineuses à la souris, la valeur de la « dose-test » au moyen d'un sérum étalon.

a) DOSE MINIMA HÉMOLYTIQUE. — Nos déterminations de la dose minima hémolytique sont faites suivant le procédé que nous indiquons dans le tableau IX. Les solutions de toxine sont préparées à 1 milligramme par centimètre cube dans de l'eau physiologique à la température du laboratoire ; les titrages sont commencés trente à soixante minutes après avoir mis les toxines en solution. Les tubes contenant des quantités variables de la toxine à examiner et 0 c. c. 1 de la suspension de globules à 5 p. 100 sont placés pendant quatre heures dans une étuve à 37°. Nous les agitons deux ou trois fois durant ce laps de temps, puis nous notons la plus petite quantité de toxine qui détermine l'hémolyse totale ou presque totale des globules employés ; elle représente la dose minima hémolytique de l'échantillon considéré. Nous laissons les tubes à la température du laboratoire jusqu'au lendemain ; en les examinant à nouveau, nous avons généralement constaté que la notation qui est alors faite coïncide avec celle de la veille.

Dans le tableau XI nous donnons les poids de toxine qui représentent la dose minima mortelle et la dose minima hémolytique de 9 échantillons de toxine. En calculant le rapport entre ces poids, nous avons constaté qu'il n'a pas une valeur constante ; autrement dit : *la valeur du rapport entre l'effet*

TABLEAU IX. — Détermination de la dose minima hémolytique d'un échantillon de toxine *perfringens* précipitée.

DOSE ESSAYÉE en milligrammes	QUANTITÉ de toxine employée (solution initiale à 1 milligramme par centimètre cube) en c.c.	EAU physiologique en c.c.	GLOBULES de mouton à 5 p. 100 en c.c.	VOLUME total en c.c.
0,1 . . . . .	0,1	0,8	0,1	1
0,01 . . . . .	0,1 à 1 p. 10	0,8	0,1	1
0,009 . . . . .	0,9 à 1 p. 100	0	0,1	1
0,008 . . . . .	0,8 à 1 p. 100	0,1	0,1	1
0,007 . . . . .	0,7 à 1 p. 100	0,2	0,1	1
0,006 . . . . .	0,6 à 1 p. 100	0,3	0,1	1
0,005 . . . . .	0,5 à 1 p. 100	0,4	0,1	1
0,004 . . . . .	0,4 à 1 p. 100	0,5	0,1	1
0,003 . . . . .	0,3 à 1 p. 100	0,6	0,1	1
0,002 . . . . .	0,2 à 1 p. 100	0,7	0,1	1
0,001 . . . . .	0,1 à 1 p. 100	0,8	0,1	1
0,0009 . . . . .	0,9 à 1 p. 1.000	0	0,1	1
0,0008 . . . . .	0,8 à 1 p. 1.000	0,1	0,1	1
0,0007 . . . . .	0,7 à 1 p. 1.000	0,2	0,1	1
0,0003 . . . . .	0,3 à 1 p. 1.000	0,6	0,1	1

toxique et l'effet hémolytique d'un échantillon de toxine *perfringens* précipitée varie d'un échantillon à l'autre.

Voici quelques chiffres :

D. M. M. de la toxine E35 . . . . . 0 milligr. 075  
D. M. H. de la toxine E35 . . . . . 0 milligr. 0005

Le rapport entre ces deux chiffres est de 150.

D. M. M. de la toxine E36 . . . . . 0 milligr. 053  
D. M. H. de la toxine E36 . . . . . 0 milligr. 0009

Le rapport entre ces deux valeurs est de 61.

Signalons qu'après chauffage à 100°, en tube scellé, les solutions des toxines E28 et E33, dont les doses minima hémolytiques sont, respectivement, de 0 milligr. 0003 et 0 milligr. 0004 n'hémolysent plus aux doses de 0 milligr. 01, 0 milligr. 1 et même 0 milligr. 5.

Ajoutons aussi que l'activité hémolytique de quelques échantillons de toxine *perfringens* précipitée, conservés à 2°, à l'état sec et en ampoules scellées sous le vide, est très stable : par exemple, la dose minima hémolytique de la toxine E 8,



préparée le 22 octobre 1936, est demeurée égale à 0 milligr. 003 de février 1937 à juillet 1940. De même, la D. M. H. des échantillons E 9 et E 13, déterminée quelques mois après leur préparation, et plusieurs fois depuis trois ans, reste inchangée. Par contre, 4 autres échantillons ont perdu en neuf mois 50 à 60 p. 100 de leur activité hémolytique ; mais signalons qu'ils récupèrent leur valeur hémolytique en présence de cystéine en solution dans du bouillon Vf.

b) TITRE HÉMOLYTIQUE DE LA TOXINE PERFRINGENS ÉVALUÉ PAR LA MÉTHODE AU SÉRUM ÉTALON. — Nous avons déterminé, au moyen de deux sérums étalons, le titre hémolytique de 9 échantillons de toxine, c'est-à-dire le poids de toxine qui, après une heure de contact, à 37°, avec 1/10 d'unité antitoxique d'un sérum étalon, est capable d'hémolyser la moitié environ des globules présents dans 0 c. c. 1 d'une suspension globulaire à 5 p. 100 (globules de mouton). Comme sérums étalons, nous avons utilisé ceux qui nous ont servi à déterminer *in vivo* la « dose-test » toxique (6) des mêmes échantillons de toxine (expériences sur souris, p. 229).

1° *Technique de la détermination du titre hémolytique d'un échantillon de toxine.* — Pour réaliser ce titrage, nous avons préparé les mélanges indiqués dans le tableau X. Les mélanges de toxine et de sérum étalon sont maintenus pendant une heure à 37°. Au bout de ce temps, nous ajoutons dans chaque tube 0 c. c. 1 d'une suspension globulaire à 5 p. 100 (globules frais de mouton, lavés à l'eau physiologique). Nous agitons

(6) Rappelons que nous avons employé une unité antitoxique de sérum étalon pour préciser la « dose-test » toxique de chacun de nos échantillons de toxine. N'ayant pas eu à notre disposition une quantité suffisante de sérum étalon, nous avons dû déterminer le titre hémolytique de nos toxines vis-à-vis de 1/10 d'unité antitoxique des sérums étalons danois ou français ; nos échantillons de toxine étant très hémolytiques, la précision de ces déterminations a été très satisfaisante.

En recherchant vis-à-vis d'une unité antitoxique du sérum étalon français la valeur de la « dose-test hémolytique » de l'échantillon de toxine E 33, c'est-à-dire le poids de toxine qui, après une heure de contact à 37° avec une unité antitoxique de ce sérum, hémolyse la moitié environ des globules présents dans 0 c. c. 1 de globules de mouton à 5 p. 100, nous avons constaté que le « titre hémolytique » d'une toxine, évalué comme nous l'avons dit précédemment, représente approximativement le dixième de la valeur de la « dose-test hémolytique ».

TABLEAU X. — Détermination du titre hémolytique  
d'une toxine *perfringens* au moyen d'un sérum étalon.

TITRE ESSAYÉ en milligrammes	1 HEURE DE CONTACT A 37°			GLOBULES de mouton à 5 p. 100 en c.c.
	Volume de toxine employé (solution à 1 milligramme par centimètre cube) en c.c.	Sérum étalon (solution à 1 unité antitoxique par centimètre cube) en c.c.	Eau physiologique en c.c.	
0,1 . . . . .	0,1	0,1	0,7	0,1
0,09 . . . . .	0,9 à 1 p. 10	0,1	0	0,1
0,08 . . . . .	0,8 à 1 p. 10	0,1	0	0,1
0,07 . . . . .	0,7 à 1 p. 10	0,1	0,1	0,1
0,06 . . . . .	0,6 à 1 p. 10	0,1	0,2	0,1
0,05 . . . . .	0,5 à 1 p. 10	0,1	0,3	0,1
0,04 . . . . .	0,4 à 1 p. 10	0,1	0,4	0,1
0,03 . . . . .	0,3 à 1 p. 10	0,1	0,5	0,1
0,02 . . . . .	0,2 à 1 p. 10	0,1	0,6	0,1
0,01 . . . . .	0,1 à 1 p. 10	0,1	0,7	0,1

les tubes et nous les mettons pendant quatre heures dans une étuve à 37° ; au bout de ce temps, nous faisons une première lecture des résultats. Nous laissons les tubes à la température du laboratoire et, le lendemain, nous faisons la deuxième lecture. Jusqu'à présent, les observations faites au cours des deux examens ont concordé.

En répétant les mêmes dosages à vingt-quatre heures d'intervalle, nous avons constaté que le titre hémolytique des solutions à 1 milligramme de toxine par centimètre cube, conservées à 2°, restait stable dans le cas des toxines E 28 et P 29; au cours d'un autre contrôle nous avons noté qu'une solution faite depuis quarante-huit heures était plus hémolytique que le jour de la préparation. C'est le cas de la solution à 1 milligramme par centimètre cube de la toxine E 37. Le jour de la préparation, le titre hémolytique de la solution, déterminé avec le sérum étalon danois, était de 0 milligr. 073 et, quarante-huit heures plus tard, de 0 milligr. 065.

2° Résultats des titrages effectués avec le sérum étalon danois. — Dans le tableau XI nous avons indiqué la « dose-test » toxique, déterminée *in vivo*, et le titre hémolytique de 9 échantillons de toxine. Dans le but de voir plus aisément si



TABLEAU XI. — Dose-test et titre hémolytique de 9 échantillons de toxine *perfringens* précipitée. Titrages effectués comparativement avec deux sérums étalons.

ÉCHANTILLON DE TOXINE			DOSE-TEST toxique déterminée avec le sérum étalon		TITRE hémolytique déterminé avec le sérum étalon		RAPPORT $\frac{\text{dose-test toxique danoise}}{\text{dose-test hémolytique danoise}}$
Numéro	D. M. M. (milligr.)	D. M. H. (milligr.)	Danois (milligr.)	Français (milligr.)	Danois (milligr.)	Français (milligr.)	
E 32 . . . .	0,08	0,0009	1,1	0,8	0,02	0,045	1,1 : 0,2 = 5,5
E 31 . . . .	0,045	0,06095	1,2	1,2	0,035	0,05	1,2 : 0,35 = 3,4
E 33 . . . .	0,045	0,0004	1,3	0,75	0,03	0,03	1,3 : 0,3 = 4,3
E 35 . . . .	0,075	0,0005	1,3	1,15	0,035	0,06	1,3 : 0,35 = 3,7
E 36 . . . .	0,055	0,0009	1,6	1,75	0,055	0,08	1,6 : 0,55 = 2,9
E 28 . . . .	0,08	0,0005	1,7	1,2	0,03	0,04	1,7 : 0,3 = 5,6
E 42 . . . .	0,065	0,0015	2,55	1,5	0,07	0,095	2,55 : 0,7 = 3,6
E 37 . . . .	0,07	0,002	2,7	2,6	0,075	0,09	2,7 : 0,75 = 4,1
P 29 . . . .	0,13	0,002	3,2	3	0,065	0,1	3,2 : 0,65 = 4,9

les résultats des titrages effectués *in vivo* et *in vitro* varient dans le même sens, nous avons classé les toxines d'après les valeurs croissantes de la « dose-test » établie au moyen du sérum étalon danois.

L'examen de ce tableau montre que les toxines E 31, E 33, E 35, qui sont comparables par la valeur de leur « dose-test » (1,2 et 1,3), le sont aussi par la valeur de leur titre hémolytique ; celui-ci est égal à 0 milligr. 03 ou 0 milligr. 035. La « dose-test » de la toxine E 42 est de 2 milligr. 55 ; elle est donc environ 2 fois plus élevée que celle des toxines précédentes ; le titre hémolytique de cette toxine se présente aussi sous un poids double de celui des toxines E 31, E 33, E 35.

Ces résultats pourraient faire penser que la détermination, *in vitro*, du titre hémolytique des toxines *perfringens* renseigne sur l'ordre de grandeur de la « dose-test » des mêmes toxines. Les résultats suivants montrent qu'il n'en est pas toujours ainsi : le titre hémolytique des toxines E 28 et E 33 est le même (0,03) et cependant leurs « doses-test » diffèrent

de 30 p. 100 ; les toxines E 28 et E 36 ont des titres hémolytiques nettement différents alors que les valeurs de leur « dose-test » sont voisines (1 milligr. 6 et 1 milligr. 7).

Pour mieux apprécier les variations qui existent entre les résultats que nous avons obtenus au cours des titrages *in vivo* et *in vitro*, nous avons calculé, pour chaque échantillon de toxine *perfringens*, le rapport entre le poids de toxine dont l'effet toxique est neutralisé par une unité antitoxique de sérum étalon danois dans les expériences *in vivo* et le poids de toxine dont l'effet hémolytique serait neutralisé par la même quantité de sérum dans les expériences *in vitro*, c'est-à-dire le rapport entre la « dose-test » toxique et la « dose-test » hémolytique de cet échantillon. Nous indiquons les valeurs de ce rapport dans la 4<sup>e</sup> colonne du tableau XI : nous voyons qu'elles sont comprises entre 2,9 et 5,6. En effet :

Dans le cas de la toxine E<sub>28</sub> ce rapport est égal à . . .  $\frac{1,7}{0,3} = 5,6$

Dans le cas de la toxine E<sub>31</sub> ce rapport est égal à . . .  $\frac{1,2}{0,35} = 3,4$

Dans le cas de la toxine E<sub>33</sub> ce rapport est égal à . . .  $\frac{1,3}{0,3} = 4,3$

Dans le cas de la toxine E<sub>36</sub> ce rapport est égal à . . .  $\frac{1,6}{0,55} = 2,9$

Ceci montre que le poids de toxine que neutralise une unité antitoxique du sérum danois est, d'après les titrages *in vivo*, trois à six fois environ plus élevé que celui dont l'effet hémolytique est neutralisé *in vitro* ; autrement dit : la « dose-test » d'un échantillon de toxine, déterminée *in vivo*, est environ trois à six fois plus élevée que « la dose-test hémolytique » déterminée *in vitro*.

De la comparaison des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* il ressort que les mélanges de toxine et de sérum étalon danois injectés aux souris sont fortement hémolytiques vis-à-vis des globules de mouton lorsque tout phénomène secondaire d'atténuation de la toxine est évité. En effet : d'après le titrage *in vivo*, une unité antitoxique du sérum étalon danois neutralise 1 milligr. 3 de la toxine E 33 ; d'après les déterminations *in vitro*, une unité antitoxique du même sérum neutralise l'effet hémolytique de 0 milligr. 3 seulement de cette toxine. La dose minima hémolytique de la toxine E 33 étant de 0 milligr. 0004, le mélange d'une unité antitoxique de sérum danois et de 1 milligr. 3 de toxine E 33 (mélange qui, dans les expériences *in vivo*, précise la valeur de la « dose-test » de cette toxine) contient :  $\frac{1,3 - 0,3}{0,0004} = 2.500$  doses hémolytiques non neutralisées par le sérum étalon.

3° Résultats des titrages effectués comparativement avec les sérums étalons danois et français. — En comparant les résultats obtenus le même jour au cours des titrages effectués *in vitro* avec les sérums étalons danois et français, nous avons



constaté que le *sérum danois* est généralement moins anti-hémolytique que le *sérum français*. En effet :

Un dixième d'unité du *sérum danois* neutralise l'effet hémolytique de 0 milligr. 035 de la toxine E 35, 0 milligr. 065 de la toxine P 29, 0 milligr. 075 de la toxine E 37, tandis qu'un dixième d'unité du *sérum étalon français* neutralise respectivement 0 milligr. 06, 0 milligr. 1 et 0 milligr. 09 des toxines E 35, P 29, E 37.

Si on compare entre eux les résultats des titrages effectués *in vivo* et *in vitro*, avec les deux sérums, on note les observations suivantes :

1° Le *sérum étalon français*, aussi antitoxique que le *sérum étalon danois* vis-à-vis de la toxine E 31, a la même valeur anti-hémolytique que ce *sérum* vis-à-vis de cette toxine ; en effet, une unité antitoxique des deux sérums neutralise l'effet toxique de 1 milligr. 2 de cette toxine (titrages sur souris) ; 1/10 d'unité de ces deux sérums inhibe, *in vitro*, l'effet hémolytique de 0 milligr. 035 de cette toxine.

La valeur de la « dose-test » de la toxine E 31 est donc de 1 milligr. 2 et son titre hémolytique de 0 milligr. 035 que le titrage soit fait avec les sérums danois ou français.

2° Le *sérum étalon français*, légèrement plus antitoxique que le *sérum étalon danois* vis-à-vis de la toxine E 36, est plus anti-hémolytique que ce *sérum*.

La « dose-test française » de cette toxine est de 1 milligr. 75. La « dose-test danoise » est de 1 milligr. 6.

Le titre hémolytique déterminé avec le *sérum français* est de 0 milligr. 08 ; le titre hémolytique évalué avec le *sérum danois* est de 0 milligr. 055 seulement.

3° Le *sérum étalon français*, moins antitoxique que le *sérum étalon danois*, vis-à-vis des toxines E 32, E 28, E 42, par exemple, est plus anti-hémolytique vis-à-vis de ces toxines que le *sérum danois*. En effet :

Dans les expériences *in vivo*, une unité antitoxique du *sérum français* neutralise 1 milligr. 5 de la toxine E 42 ; une unité antitoxique du *sérum danois* neutralise 2 milligr. 55 de cette toxine. La « dose-test » de la toxine E 42 est donc de 1 milligr. 5 ou de 2 milligr. 55 suivant le *sérum étalon* employé pour faire le titrage.

Dans les expériences *in vitro*, 1/10 d'unité du sérum étalon français neutralise 0 milligr. 095 de la toxine E42 ; la même quantité de sérum étalon danois neutralise 0 milligr. 07 de toxine E42. Le titre hémolytique de la toxine considérée est donc de 0 milligr. 095 ou de 0 milligr. 07 selon que le sérum utilisé pour faire le titrage est un sérum étalon français ou danois.

De l'ensemble de ces expériences, nous concluons que le *titre hémolytique d'un échantillon de toxine perfringens*, de même que la « dose-test » toxique de cet échantillon, *peut varier avec le sérum étalon employé pour faire le titrage*, de sorte que pour comparer l'effet toxique et l'effet hémolytique des toxines préparées dans différents pays, il faut effectuer les titrages avec le même sérum étalon.

#### C. — TITRE ANTI-HÉMOLYTIQUE DES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.

Pour déterminer vis-à-vis d'un échantillon de toxine *perfringens* A le titre anti-hémolytique d'un sérum homologue, il faut ajouter à une quantité fixe de cet échantillon des doses variables du sérum à titrer, puis des globules de mouton pour déceler les doses de sérum qui ont inhibé l'effet hémolytique de la toxine. Dans nos expériences antérieures (7) nous avons employé comme quantité de toxine, un *poids arbitraire*, celui qui représentait 20 doses minima hémolytiques de cet échantillon. Nos titrages actuels, réalisés en mai 1940, ont été effectués d'après le principe de standardisation des toxines et des sérums : pour évaluer le titre anti-hémolytique d'un sérum nous avons employé comme dose d'épreuve de toxine le poids qui est neutralisé, dans les conditions que nous avons notées précédemment (p. 337), par 1/10 d'unité antitoxique du sérum étalon danois.

Nous avons ainsi recherché la valeur anti-hémolytique de 3 sérums anti-*perfringens* vis-à-vis des 9 échantillons suivants de toxine *perfringens* titrés la veille : E 28, E 31, E 32, E 33, E 35, E 36, E 37, P 29, E 42. Rappelons que le poids de chacun de ces échantillons de toxine qui est neutralisé par 1/10 d'unité

(7) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Acad. des Sc.*, 204, 1937, p. 1012.



du sérum étalon danois est respectivement de : 0,03, 0,035, 0,02, 0,03, 0,035, 0,055, 0,075, 0,065, 0,07 milligrammes (tableau XI).

Nous indiquons dans le tableau XI les solutions que nous

TABLEAU XII. — Détermination du titre anti-hémolytique d'un sérum vis-à-vis d'un échantillon donné de toxine *perfringens* précipitée.

TITRE ESSAYÉ	UNE HEURE DE CONTACT A 37°			GLOBULES de mouton à 5 p. 100 en centimètre cube	VOLUME TOTAL en centimètre cube
	Sérum 714 en centimètre cube	Toxine <i>perfringens</i> E <sup>22</sup> (solution à 0 milligr. 1 par centimètre cube)	Eau physiologique en centimètre cube		
Premier titrage :					
1 unité.	0,1	0,2 [= 0 milligr. 02](1)	Q. S. pour 0,9	0,1	1
5 unités.	0,2 à 1 p. 10	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
10 unités.	0,1 à 1 p. 10	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
25 unités.	0,4 à 1 p. 100	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
50 unités.	0,2 à 1 p. 100	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
100 unités.	0,1 à 1 p. 100	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
500 unités.	0,2 à 1 p. 1.000	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
1.000 unités.	0,1 à 1 p. 1.000	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
Deuxième titrage :					
300 unités.	0,2 à 1 p. 600	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
400 unités.	0,2 à 1 p. 800	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
500 unités.	0,1 à 1 p. 500	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
600 unités.	0,1 à 1 p. 600	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
700 unités.	0,1 à 1 p. 700	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
800 unités.	0,1 à 1 p. 800	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1
900 unités.	0,1 à 1 p. 900	0,2	Q. S. pour 0,9	0,1	1

(1) Ce poids de toxine représente le titre hémolytique de la toxine E32 déterminé avec le sérum étalon danois.

préparons pour titrer un sérum. Les mélanges de sérum et de toxine sont laissés pendant une heure à 37° ; ils sont ensuite additionnés de 0 c. c. 1 de la suspension globulaire à 5 p. 100 et remis à l'étuve. Au bout de quatre heures, nous recherchons dans quel tube la moitié environ des globules est hémolysée ; si ce tube contient, par exemple, 0 c. c. 1 de sérum dilué à 1/300, le titre anti-hémolytique du sérum est de 300 unités par centimètre cube (puisque 0 c. c. 1 de ce sérum dilué à 1/300 neutralise la même quantité de toxine qu'un dixième d'unité du sérum étalon).

Les résultats des titrages ainsi effectués sont groupés dans le tableau XIII. Dans ce tableau, nous donnons aussi, exprimés en unités internationales, les titres *antitoxiques* des mêmes sérums.

En comparant les résultats des déterminations *in vitro*, on

TABLEAU XIII. — Titre anti-hémolytique et titre antitoxique de trois sérums anti-*perfringens* A.

ÉCHANTILLON DE TOXINE			SÉRUM 135		SÉRUM 415		SÉRUM 714	
Numéro	« Dose-test »	Titre hémolytique	Titre anti-hémolytique	Titre antitoxique	Titre anti-hémolytique	Titre antitoxique	Titre anti-hémolytique	Titre antitoxique
	(milligr.)	(milligr.)	(unités)	(unités)	(unités)	(unités)	(unités)	(unités)
E 28.	1,7	0,03	20-30	100-125	1 500	400-450	600	250-300
E 31.	1,2	0,035	10-20	150-175	1.000-1.200	350-400	400-450	300-350
E 32.	1,1	0,02	25-30	40-50	1 200	400	500	350
E 33.	1,3	0,03	10-20	125	1.200-1.400	350	500	200-500
E 35.	1,3	0,06	10-25	100	1.200-1.500	450	800	300
E 36.	1,6	0,055	25	150-200	1.000-1.200	350-400	600	350
E 37.	2,6	0,075	10-25	100-125	1.200-1.500	450-500	800	300-350
P 29.	3,2	0,065	25-50	150	1.500-2 000	400	800	350-400
E 42.	2,55	0,07	25-50	100	1.200-1.500	250-300	800	250-300

constate que le titre anti-hémolytique d'un sérum peut varier avec l'échantillon de toxine utilisé pour faire le titrage. Ex. : Le sérum 714 titre 400 à 450 unités anti-hémolytiques lorsque le titrage est fait avec la toxine E31 ; 500 unités lorsqu'il est effectué avec les toxines E32, E33 ; 600 unités lorsqu'il est effectué avec les toxines E28, E36 ; 800 unités lorsqu'il est effectué avec les toxines E35, E37, P29 et E42.

De ces résultats, nous concluons que nos échantillons de toxine *perfringens* A doivent contenir, à des taux variés, plusieurs substances à propriétés hémolytiques *in vitro* vis-à-vis des hématies de mouton.

Rappelons les notions suivantes : d'après Schnayerson et Samuels, la toxine *perfringens* contient 2 hémotoxines : l'hémotoxine A active *in vitro* et probablement *in vivo*; l'hémotoxine B active seulement *in vivo*; d'après Stewart (1940), le *B. perfringens* produit 2 hémolysines déce-



lables *in vitro* : l'une hémolyse les globules de mouton et de souris, l'autre, pratiquement sans effet sur les globules de mouton, lyse intensément les hématies de souris.

Nous avons déjà donné de nombreux exemples indiquant que le titre antitoxique d'un sérum anti-*perfringens* A varie fréquemment avec l'échantillon de toxine. Le titre antitoxique du sérum 714, par exemple, est de 200 à 250, 250, 300, 300 à 350 ou de 350 unités suivant que le titrage est fait avec les toxines E 33, E 32, E 35, E 37, E 36. Nos recherches actuelles établissent que :

1° *Les variations des titres anti-hémolytiques et antitoxiques d'un sérum vis-à-vis de plusieurs échantillons de toxine ne sont pas toujours parallèles.*

Exemple : a) le sérum 714 titre 800 unités anti-hémolytiques vis-à-vis de la toxine E35 et 600 unités anti-hémolytiques vis-à-vis de la toxine E36. Ce sérum est donc plus anti-hémolytique vis-à-vis de la première toxine que vis-à-vis de la deuxième.

Les titrages *in vivo* indiquent des variations en sens contraire : le sérum 714 est moins antitoxique vis-à-vis de la toxine E35 que vis-à-vis de la toxine E36 ; il titre en effet 300 unités lorsque le titrage est fait avec la toxine E35 et 350 unités lorsque celui-ci est réalisé avec la toxine E36.

b) Le titre anti-hémolytique du sérum 135 vis-à-vis de la toxine E32 est environ deux fois plus élevé que le titre anti-hémolytique vis-à-vis de la toxine E31 ; le titre antitoxique déterminé avec la toxine E32 est trois à quatre fois plus faible que le titre trouvé avec la toxine E31.

2° *Deux sérums qui ont la même valeur antitoxique ou des valeurs antitoxiques voisines, d'après les titrages effectués avec un échantillon donné de toxine, peuvent avoir, vis-à-vis de cet échantillon, des titres anti-hémolytiques qui diffèrent de 50 p. 100.*

Cette observation montre que, contrairement à l'opinion de Henry, de Glenny et ses collaborateurs, les déterminations du titre anti-hémolytique des sérums anti-*perfringens* A ne renseignent pas toujours sur la valeur antitoxique globale de ces sérums.

Par exemple, en utilisant la toxine E36 pour déterminer le

titre antitoxique et le titre anti-hémolytique des sérums 413 et 714, nous avons obtenu les chiffres suivants : Le sérum 413 titre 330 à 400 unités antitoxiques et 1.000 à 1.200 unités anti-hémolytiques. Le sérum 714 titre 330 unités antitoxiques et seulement 600 unités anti-hémolytiques.

Nous avons observé, au cours de plusieurs titrages, des différences encore plus grandes entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. Le sérum 133 est trente à cent fois moins anti-hémolytique que les sérums 413 et 714 et, cependant, il ne contient que deux à quatre fois moins d'antitoxine qu'eux.

Le sérum 133 titre, en effet, entre 10 et 23 unités anti-hémolytiques et entre 100 et 173 unités antitoxiques lorsque le titrage est réalisé avec les toxines E 31, E 33, E 35, E 37 (voir tableau XIII).

Le sérum 413 titre, au contraire, entre 1.000 et 1.500 unités anti-hémolytiques et entre 330 et 500 unités antitoxiques d'après les titrages faits avec les mêmes toxines ; le sérum 714 titre entre 400 et 800 unités anti-hémolytiques et entre 200 et 330 unités antitoxiques vis-à-vis des mêmes toxines.

De ces résultats, nous concluons que l'évaluation *in vitro* du titre anti-hémolytique des sérums anti-*perfringens* A ne peut dispenser actuellement de rechercher, par la méthode des injections à l'animal, le titre antitoxique de ces sérums.

\*  
\* \* \*

Au début de notre exposé, nous avons émis l'opinion qu'il faudrait indiquer non seulement le pouvoir antitoxique global d'un sérum, mais encore déterminer les quantités des différents anticorps qu'il contient. Nous venons de voir que les déterminations du titre anti-hémolytique permettent de déceler des différences entre divers sérums. Il conviendrait de préciser aussi leur titre anti-nécrosant, anti-neurotoxique et d'étudier leur pouvoir anti-fermentaire.

Dès 1902, Tissier et Martelly (8) ont signalé que le *B. perfringens* est un agent protéolytique. Ultérieurement il a été constaté que de nombreuses souches de *B. perfringens*, mais non toutes, attaquent lentement l'ovalbumine et le

(8) TISSIER (Henri) et MARTELLY. Ces *Annales*, **16**, 1902, p. 865.

sérum coagulés, qu'un petit nombre seulement produit de l'indol et que toutes liquéfient la gélatine. Dernby et Blanc (1921), Stahly et Werkman (1933), Walbum et Reymann [1933] (9) ont longuement examiné les propriétés gélatinolytiques des filtrats de *B. perfringens*. Nous n'avons pas repris leurs travaux ; mais après avoir observé que la gélatine est liquéfiée aussi par la toxine *perfringens* précipitée, nous avons comparé l'intensité de la liquéfaction exercée par quelques échantillons de toxine *perfringens*, à la température de 38°, dans des quantités égales de gélatine de pH variables afin de rechercher ensuite, vis-à-vis des échantillons titrés dans ces conditions, le pouvoir anti-gélatinolytique des sérums anti-*perfringens*.

## II. — Action gélatinolytique de la toxine *perfringens* précipitée.

Pour étudier les propriétés gélatinolytiques de la toxine *perfringens* précipitée, nous avons choisi, parmi nos échantillons de toxine, les quatre suivants : E9, E13, E27, E28, dont les « doses-test anglaises » respectives sont de 2,65, 1,7, 1,8, 1,7 milligrammes ; les « doses-test françaises » de 3,2, 1,75, 1,2, 1,2 milligrammes ; les D. M. M. 0,14, 0,075, 0,08, 0,08 milligrammes et les doses hémolitiques 0,002, 0,007, 0,0005.

Notre choix a été guidé par les considérations suivantes : 1° la valeur de la « dose-test anglaise » de l'échantillon E9 (2 milligr. 65) est *nettement inférieure* à la « dose-test française » (3 milligr. 2) de cet échantillon ; 2° dans le cas de l'échantillon E13, la valeur de la « dose-test anglaise » est sensiblement *égale* à la valeur de la « dose-test française » ; 3° les « doses-test anglaises » 1,8 et 1,7 des deux autres échantillons sont *supérieures* à la « dose-test française » (1 milligr. 2). Faisons remarquer que les toxines E27 et E28 sont comparables par la D. M. M., la dose hémolitique et les « doses-test ».

(9) DERNBY (K. G.) et BLANC (J.). *J. Bact.*, 6, 1921, p. 419 ; STAHLY (G. L.) et WERKMAN (C. H.). *J. Bact.*, 25, 1933, p. 37 ; WALBUM (L. E.) et REYMAN (C. G.). *J. Path. a. Bact.*, 36, 1933, p. 469.



Pour comparer, à différents pH et à la température de 38°, l'action gélatinolytique des 4 échantillons de toxine indiqués, nous avons pris, comme dose d'épreuve de chacun d'eux, le poids de toxine que neutralise une unité antitoxique du sérum étalon anglais c'est-à-dire une « dose-test » de chaque échantillon (10).

Dans une série de tubes contenant 2 cent. cubes de gélatine à 3 p. 100, de pH variables, nous avons ajouté (en solution dans 1 cent. cube d'eau physiologique) une « dose-test anglaise » d'un des échantillons de toxine choisis : E 27 par exemple.

Au cours d'essais préalables, nous avons constaté que les pH (11) des mélanges des différents tubes s'échelonnaient, aussitôt après leur préparation, entre 6,1 et 7,9.

Après avoir laissé les tubes pendant six heures dans un bain-marie à 38°, nous avons titré l'acidité libre apparue dans chaque mélange, puis nous avons évalué l'acidité aminée (12).

(10) Dans ces recherches, nous pouvions ajouter à la quantité choisie de gélatine, soit une « dose-test anglaise », soit une « dose-test française », soit une « unité » de toxine (c'est-à-dire 20 D. M. M. de l'échantillon considéré), soit encore un poids fixe de toxine, 2 milligrammes par exemple. Nous avons utilisé, comme dose d'épreuve de toxine, une « dose-test anglaise » de chaque échantillon parce que c'est cette quantité de toxine qui est employée dans les expériences de titrage *in vivo* des sérums.

(11) Déterminations faites avec des indicateurs colorés et au moyen du comparateur de Hellige.

(12) Pour effectuer cette détermination, nous avons appliqué la méthode au formol de SÖRENSEN, perfectionnée par Henriques et Gjaldbæk, méthode qui a fourni à WILLSTATTER et WALDSCHMIDT-LEITZ des résultats équivalents à ceux qu'ils ont obtenus par leur procédé à l'alcool. Nous l'avons couramment employée au cours de nos recherches sur l'intensité de l'action protéolytique du suc pancréatique activé par l'entérokinase (Maylis GUILLAUMIE. *Thèse de Doctorat es Sciences*, Paris, 1933, p. 51, 64 ; *C. R. de la Soc. de Biol.*, **416**, 1934, p. 624 et 728 ; *ibid.*, **417**, 1934, p. 747 ; *ibid.*, **418**, 1935, p. 1049 ; *ibid.*, **422**, 1936, p. 51). Dans les recherches actuelles, nous avons titré, avec de la soude N/10, l'acidité que libère le formol dans chaque mélange de gélatine et de toxine maintenu pendant six heures à 38° et dans le mélange identique correspondant non placé à l'étuve (tube témoin). La différence entre les chiffres fournis par ces deux titrages représente l'acidité aminée qui résulte de l'action gélatinolytique de la toxine dans le mélange sorti de l'étuve.

Nous avons constaté qu'une « dose-test » de la toxine E27 détermine en six heures à 38° une acidité totale (libre et aminée) qui est neutralisée, après addition de formol, par 0 c. c. 4 de NaOH N/10 à n'importe lequel des pH examinés (6,1, 6,85, 7,25, 7,45). En répétant cette expérience, nous avons obtenu les mêmes résultats. Dans les mêmes conditions, nous l'avons effectuée aussi avec les échantillons de toxine E9, E13, E28 (13). Nous groupons quelques-uns de nos résultats dans le tableau XIV. Ces chiffres montrent que :

TABLEAU XIV. — Effet gélatinolytique, à différents pH, de plusieurs échantillons de toxine *perfringens* précipitée.

ÉCHANTILLON de toxine	ACIDITÉ produite (libre et aminée)	pH INITIAL DU MÉLANGE DE TOXINE ET DE GÉLATINE						
E13 . . . . .	0,4		6,1	6,3	6,9	7,3		
E27 . . . . .	0,4		6,1		6,85	7,25	7,45	7,9
E28 . . . . .	0,4 0,35	6,05			6,85	7,3	7,4	7,9
E9 . . . . .	0,4 0,35	6,05			6,85	7,05	7,45	

1° aux pH indiqués, l'intensité de la liquéfaction de la gélatine produite en six heures à 38° par une « dose-test » de toxine est pratiquement indépendante du pH ; 2° les 4 échantillons de toxine, à la dose employée, exercent sur la gélatine une action liquéfiant de même intensité : ils font en effet subir à 2 cent. cubes de gélatine à 3 p. 100 des transformations de même ordre, neutralisables après addition de formol par 0,35 ou 0,4 cent. cubes de NaOH N/10.

Nous avons effectué toutes ces expériences préliminaires sans ajouter de solutions-tampon à la gélatine (14). Il serait

(13) Le pH des solutions contenant une « dose-test » de toxine par centimètre cube est compris entre 5,6 et 5,9.

(14) En ajoutant à de la gélatine non tamponnée des mélanges de toxine *perfringens* et de sérum anti-*perfringens* préalablement maintenus pendant une heure à 37°, nous avons constaté que les deux sérums examinés n'exerçaient, vis-à-vis d'une « dose-test » des toxines E9, E13 ou E27, qu'un effet anti-gélatinolytique minime à la dose de

intéressant, d'une part, d'examiner un plus grand nombre d'échantillons de toxine, et d'autre part, de réaliser les essais en milieu tamponné. Si on trouvait d'une manière constante que l'action liquéfiant exercée sur une quantité fixe de gélatine par une « dose-test » de divers échantillons de toxine est neutralisée, après six heures d'étuve à 38° par exemple, par la même quantité  $n$  de soude, on pourrait utiliser cette réaction pour rechercher rapidement la valeur approchée de la « dose-test » d'un échantillon de toxine de titre inconnu : dans une série de tubes contenant la même quantité de gélatine, on ajouterait des doses croissantes de la toxine à titrer ; après six heures d'étuve à 38° on évaluerait l'intensité de la gélatinolyse dans les différents tubes. La quantité de toxine qui déterminerait une gélatinolyse neutralisable par un nombre voisin de  $n$  centimètres cubes de soude, indiquerait l'ordre de grandeur de la « dose-test » de l'échantillon considéré. Il suffirait alors d'effectuer un seul titrage sur souris pour déterminer la valeur précise de la « dose-test ».

Avant de réaliser ces essais, nous avons d'abord recherché l'intensité de la liquéfaction de la gélatine en fonction de la durée d'incubation, puis l'intensité de la gélatinolyse que produisent au bout du même temps des quantités croissantes de toxine.

#### GÉLATINOLYSE EN FONCTION DE LA DURÉE D'INCUBATION.

Dans une série de tubes contenant 2 cent. cubes de gélatine à 3 p. 100 nous avons mis 1 cent. cube d'une solution de toxine contenant une « dose-test » par centimètre cube (toxine E13 ou E27). Immédiatement après leur préparation, le pH des mélanges était de 6,4. En évaluant après trois, six et vingt-quatre heures d'étuve à 38° l'action gélatinolytique de la toxine, nous avons observé les résultats suivants :

L'acidité totale est neutralisée, après trois heures d'étuve, par 0 c. c. 23 de NaOH N/10 ; après six heures d'étuve, par

0 c. c. 5. Les titres antitoxiques de ces sérums, d'après les déterminations sur souris et les titres antinécrosants déterminés par la méthode des injections intradermiques au lapin, étaient de 200 à 300 unités.



0 c. c. 4 de NaOH N/10 et après vingt-quatre heures d'étuve, par 0 c. c. 7 de NaOH N/10.

La même expérience refaite à pH 6,2-6,3 nous a donné exactement les mêmes résultats (15).

#### GÉLATINOLYSE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE TOXINE.

Pour réaliser cet essai, nous avons mis dans une série de tubes 2 cent. cubes de gélatine à 3 p. 100, les quantités voulues d'eau physiologique pour que le volume final des mélanges soit le même dans tous les tubes, et des volumes croissants (0 c. c. 25, 0 c. c. 5, 0 c. c. 75, 1 cent. cube) d'une solution contenant, par centimètre cube, une « dose-test » de toxine E 27 (pH initial de tous les mélanges : 6-6,1).

Nous avons laissé les tubes pendant six heures dans un bain-marie à 38°. Puis nous avons déterminé, comme dans les expériences précédentes, l'acidité totale (libre et aminée) due à l'action gélatinolytique de la toxine. Nous avons constaté que l'acidité totale due à l'action de 0 c. c. 25, 0 c. c. 5, 0 c. c. 75 et 1 cent. cube de toxine E 27 était neutralisée respectivement par 0 c. c. 2, 0 c. c. 3, 0 c. c. 35, 0 c. c. 4 de NaOH N/10.

En refaisant la même expérience à pH 6,9, 7,1 et 7,25, nous avons obtenu exactement les mêmes chiffres ; le faible écart qui existe entre le premier et le dernier montre que les résultats du titrage des toxines par l'épreuve de la gélatine, en milieu non tamponné, ne sont pas aussi précis que ceux que l'on obtient par la méthode des injections intraveineuses à la souris.

Nous nous proposons de refaire ces expériences en milieux tamponnés et d'examiner aussi dans ces conditions les propriétés anti-gélatinolytiques des sérums anti-*perfringens* mais

(15) Nous avons effectué quelques essais analogues avec de la caséine (caséine Hammarsten). Nous avons laissé pendant trois, six et vingt-quatre-heures à 38° des tubes contenant une « dose-test » de toxine (E 13 ou E 27) et 2 cent. cubes d'une solution de caséine à 3 p. 100, pH 7,4. En recherchant ensuite par la méthode de Sørensen si la caséine était dégradée, nous avons constaté qu'elle n'était pas appréciablement attaquée par les deux échantillons de toxine *perfringens* utilisés.

en prenant soin de comparer l'effet de plusieurs tampons car nos recherches sur l'enzyme tryptique du suc pancréatique nous a révélé que certains peuvent exercer une action défavorable (16) sur l'intensité du phénomène de la liquéfaction de la gélatine.

\*  
\* \*

Nous avons signalé précédemment que les proportions relatives du facteur hémolytique  $\alpha$  et de l'agent toxique *zeta* des toxines *perfringens* préparées dans des bouillons de viande variaient beaucoup d'une préparation à l'autre, et que divers auteurs ont recherché les causes de cette variabilité. Nous pensons que les expérimentateurs doivent s'efforcer, non seulement, de trouver les éléments qui influencent dans les bouillons l'apparition et l'action de l'une des propriétés de la toxine *perfringens*, mais qu'ils doivent s'appliquer aussi, d'une part, à préparer des milieux synthétiques chimiquement définis, toujours comparables d'une préparation à l'autre et en tous lieux — afin d'obtenir des échantillons de toxine de composition sinon constante du moins voisine — d'autre part, à séparer et, éventuellement, purifier les constituants des toxines pour déterminer avec ces toxines monovalentes le taux des anticorps correspondants dans les sérums et permettre finalement une comparaison plus facile des toxines et des antitoxines préparées dans différents Instituts.

### III. — Essais de préparation de la toxine *perfringens* dans des milieux synthétiques.

Les recherches relatives à la préparation d'un milieu synthétique favorable au développement du *B. perfringens* A. n'ont pas encore abouti à des résultats satisfaisants. Malgré le grand nombre d'acides aminés employés, le pouvoir pathogène de ce bacille ne s'est pas maintenu dans les expériences

(16) GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. de Biol.*, **418**, 1935, p. 1049.

d'Erishmann (17) ; dans les nôtres, la fonction toxigène a été faible.

Au cours de nos premières expériences, nous avons employé, par litre d'eau distillée : 0 gr. 15 de chacun des acides aminés suivants : dl alanine, dl leucine, dl valine, glycine et 1 proline ; 0 gr. 05 ou 0 gr. 15 de 1 cystine ; 0 gr. 05 de 1 tryptophane, 0 gr. 05 de 1 tyrosine et 0 gr. 05 de d arginine ; 1 gramme de sulfate de magnésium, 1 gramme de phosphate monopotassique et 1 gramme de citrate de soude. Nous avons amené la solution à pH 7,7-7,8 avec de la soude, et, après l'avoir additionnée de 1 ou 5 grammes de glucose par litre, nous l'avons répartie par portions de 10 cent. cubes dans des tubes à essai : dans quelques-uns, nous avons ajouté de la craie pulvérisée. Nous avons ensuite stérilisé tous ces tubes à 110°. Le jour de l'ensemencement, nous les avons d'abord portés à la température de 100° pendant trente minutes, puis nous les avons rapidement amenés à 37° et dès qu'ils ont été ensemencés, nous avons ajouté, dans une partie, 0 milligr. 1, 0 milligr. 01, 0 milligr. 001 ou 0 milligr. 0001 d'aneurine (vitamine B<sub>1</sub>) ou 0 milligr. 00005 à 0 milligr. 001 de lactoflavine (vitamine B<sub>2</sub>). Après vingt-deux heures d'étuve à 37°, nous n'avons pas observé de développement dans les tubes sans aneurine et un léger développement en présence d'aneurine.

Pour diminuer la déficience du milieu précédent, nous lui avons ajouté les cendres de 2 grammes de *B. perfringens* A desséchés (souche Lechien) provenant de cultures en bouillon Vf. (Ces cendres, avant de les utiliser, ont été reprises par de l'eau additionnée d'acide chlorhydrique, puis neutralisées.) Nous n'avons pas encore enregistré de bons résultats.

Nous avons alors constitué le milieu suivant :

Eau distillée : 1.000 cent. cubes ; glucose (5 grammes) ; tartrate d'ammonium (0 gr. 4) ; sulfate d'ammonium (0 gr. 160) ; sulfate de zinc (0 gr. 045) ; sulfate de fer (0 gr. 045) ; silicate de potassium (0 gr. 045) ; dl alanine (0 gr. 15) ; dl leucine (0 gr. 15) ; dl valine (0 gr. 15) ; glycine (0 gr. 15) ; 1 proline (0 gr. 15) ; 1 cystine (0 gr. 05) ; 1 trypto-

(17) ERISHMANN (D.). *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasit.*, **140**, 1937, p. 273.



phane (0 gr. 05) ; l tyrosine (0 gr. 05) ; d arginine (0 gr. 05). Avant la stérilisation, la solution a été additionnée de soude jusqu'à pH 7.7-7.8 et répartie par quantités de 10 cent. cubes dans des tubes à essai. Dans une partie des tubes nous avons ajouté 0 milligr. 01 d'aneurine. Au cours d'une expérience (31 mai 1937), nous avons obtenu un bon développement accompagné d'une forte production de gaz, mais le premier repiquage n'a pas été suivi de développement. Dans une deuxième expérience (6 décembre 1937), nous n'avons pas eu de développement dès le premier ensemencement. Nous avons répété cet essai, mais en ajoutant, cette fois-ci, dans chaque tube, des fragments de foie de bœuf cuits par un chauffage de vingt minutes dans de l'eau bouillante. Nous avons stérilisé les tubes à 110°. Après les avoir amenés à la température de 35°, nous les avons ensemencés avec notre souche habituelle de bacille *perfringens*. Nous avons obtenu un bon développement dans tous les tubes, avec production abondante de gaz. Nous avons observé le même résultat au cours de 6 repiquages successifs (48).

L'influence favorable exercée par le foie de bœuf dans le milieu complexe que nous venons d'indiquer nous a incitée à rechercher si un tel effet se manifesterait aussi dans le milieu très simple suivant, que nous avons fréquemment utilisé pour étudier la nutrition du bacille tuberculeux (49) : phosphate monopotassique : 1 gramme; sulfate de magnésie : 1 gramme; citrate de soude : 1 gramme ; asparagine : 5 grammes ; glucose : 1 gramme ; eau distillée : 1.000 cent. cubes. Nous avons amené la solution à pH 7.7-7.8 avec de la soude, puis nous l'avons répartie en tubes ; dans chaque tube, nous avons mis des fragments de foie cuit (foie de bœuf) ; après stérilisation, les tubes sont refroidis à 35°, puis ensemencés avec une culture jeune de *B. perfringens* (souche Lechien) et scellés sous le vide. Au cours des trois repiquages que nous avons effectués, nous avons obtenu un très bon développement avec beaucoup de gaz.

18) Lorsque nous substituons au foie cuit 5 p. 100 de bouillon Vf (pH 7.7-7.8) fraîchement préparé ou 1,5 p. 1.000 de sang desséché de cheval, nous n'obtenons que de faibles cultures à partir du deuxième repiquage.

(19) FROUIN (A.) et GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, 42, 1928, p. 667.

Dans le but de réduire l'acidification intense des cultures réalisées dans le milieu précédent, nous avons préparé la solution suivante (pH 7,7) :

Phosphate bipotassique, en grammes. . . . .	2,5
Citrate de sodium, en gramme . . . . .	1
Sulfate de magnésium, en gramme. . . . .	0,5
Chlorure de sodium, en gramme. . . . .	1
Asparagine, en grammes. . . . .	2,5
Glucose, en gramme . . . . .	0,5
Eau distillée, en centimètres cubes . . . . .	1.000

Nous avons réparti cette solution dans une série de tubes et dans la moitié de ceux-ci nous avons ajouté des fragments de foie cuit. Nous avons procédé à la stérilisation et à l'ensemencement dans les conditions habituelles. Nous avons régulièrement obtenu une *culture abondante* dans tous les tubes contenant les fragments de foie. Ainsi, au cours de la stérilisation du milieu, et probablement aussi au cours du développement, le foie cède à la solution des principes qui permettent la multiplication du *B. perfringens*. Mais, malgré l'intensité du développement, la *toxicité* des cultures centrifugées a été faible jusqu'à présent : après dix-huit heures d'étuve à 33°, nous avons obtenu des toxines contenant au maximum 10 doses mortelles par centimètre cube ; elles ont hémolysé 0 c. c. 1 de globules de mouton à 5 p. 100 à la dose de 0 c. c. 07.

L'action favorisante du foie nous a engagée à constituer des milieux contenant de la vitamine P P et de la  $\beta$  alanine. (Il serait intéressant aussi d'étudier l'action de l'acide pimélique, mais nous n'avons encore pu le faire.) Nous avons préparé 400 cent. cubes de la solution indiquée ci-dessus. Nous l'avons divisée en quatre parties ; la première a été répartie en tubes et additionnée de fragments de foie cuit ; dans la deuxième nous avons mis : 0 gr. 15 p. 1.000 de vitamine P P et de  $\beta$  alanine ; dans la troisième : 0 gr. 15 p. 1.000 de  $\beta$  alanine et d'acide ascorbique (vitamine C) ; dans la quatrième : 0 gr. 15 p. 1.000 de vitamine P P, de  $\beta$  alanine et d'acide ascorbique. Nous avons stérilisé ces trois dernières solutions par filtration sur bougie et nous les avons séparément distribuées dans des tubes stériles que nous avons scellés aussitôt après l'ensemencement. Nous n'avons obtenu un bon développement que dans les tubes contenant du foie cuit.

Nous avons récemment éprouvé la valeur nutritive d'un milieu d'Erishmann. En voici la composition : Cl Na : 2 grammes ;  $\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$  : 1 gr. 7 ;  $\text{PO}_4 \text{ H Na}_2$  : 0 gr. 7 ;  $\text{Cl}_2 \text{ Mg}$  : 0 gr. 02 ;  $\text{Cl}_2 \text{ Ca}$  : 0 gr. 2 ; Cl  $\text{NH}_4$  : 3 grammes ; S  $\text{Na}_2$  : 0 gr. 5 ; carbonate d'arginine : 0 gr. 1 ; cystine : 0 gr. 02 ; histidine : 0 gr. 05 ; leucine : 0 gr. 12 ; tryptophane : 0 gr. 02 ; tyrosine : 0 gr. 04 ; acide ascorbique : 1 gramme ; glucose : 5 grammes ; asparaginate de sodium : 5 grammes ; glutamate de sodium : 5 grammes ; eau distillée : 1.000 cent. cubes. Nous avons stérilisé la solution par chauffage à  $100^\circ$  ou par filtration sur bougie. Avant de procéder à l'ensemencement, nous avons ou non préalablement porté à  $100^\circ$ , pendant trente minutes, les tubes contenant ce milieu nutritif. Les tubes amenés à la température de  $33^\circ$  ont été ensemencés avec une culture de vingt heures de *B. perfringens*, souche Lechien, puis scellés sous le vide et laissés ensuite pendant vingt heures à  $33^\circ$ . Le développement a été faible. En ouvrant les tubes, nous avons perçu une légère odeur d'hydrogène sulfuré. Les cultures centrifugées n'ont pas tué les souris à la dose de 0 c. c. 5, alors que la toxicité des cultures faites parallèlement en bouillon Vi était de 20 à 30 doses mortelles par centimètre cube.

\*  
\* \*

Les premiers auteurs qui ont essayé de séparer les constituants de la toxine *perfringens* A préparée à partir des bouillons de viande ont obtenu des résultats encourageants. Par des procédés différents, Prigge (20) d'une part, Stewart et Clampit (21) d'autre part, ont séparé partiellement le facteur hémolytique de la toxine *perfringens* A du facteur toxique zeta (22). Il y aurait lieu de pousser plus avant le frac-

(20) PRIGGE (R.). *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, **91**, 1937, p. 457.

(21) STEWART (S. E.) et CLAMPIT (J. M.). *Bull. de l'organ. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, vol. II, n° 5, 1938, p. 867. Ces auteurs ont également séparé les activités toxiques et hémolytiques de la toxine *perfringens* C.

(22) Tandis que SCHNEIERSON (S. S.) et GRABAR (P.) [*C. R. de la Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 1451] ne sont point parvenus à séparer par ultrafiltration fractionnée le facteur hémolytique de la toxine *perfringens* A du facteur non hémolytique, LEVENSON (S.) et GRABAR (P.) ont réussi



tionnement de la toxine *perfringens* A et d'établir, entre autre, si la propriété nécrosante bien connue de cette toxine est produite par un composé particulier. Il faudrait ensuite préparer le sérum étalon correspondant à chacun des antigènes monovalents successivement séparés et bien caractérisés, afin de pouvoir les titrer et les utiliser correctement à la détermination ultérieure du titre des sérums complexes anti-*perfringens* produits par les animaux immunisés avec la toxine *perfringens* totale (23).

Pendant que se poursuivent ces recherches d'un très grand intérêt, le procédé classique d'obtention des toxines dans les bouillons de viande est encore couramment employé dans les laboratoires qui assument la charge d'assurer la préparation des stocks de toxine nécessaires à l'immunisation des animaux producteurs d'antitoxine *perfringens* ; de nombreux expérimentateurs ont cependant essayé de l'améliorer : Bull et Pritchett (24) ont ajouté au bouillon des muscles frais et stériles de lapin ; ils ont obtenu de meilleures toxines que dans le bouillon ordinaire ; de Kruif, Adams et Ireland (25) ont avantageusement remplacé les muscles frais par de la viande cuite broyée ; Dalling et Ross ont ajouté de la viande de cheval partiellement desséchée, Stewart de la viande de bœuf dégraissée ou non ; Nagler (26) a préparé des cultures très toxiques dans du bouillon de Pope contenant des morceaux de foie cuit. Signalons toutefois que, d'après Walbum et Reymann (27), le muscle frais, la viande coagulée, le foie cuit ou le sang défibriné de cheval n'augmentent pas la valeur nutritive du bouillon de veau peptoné à 1 p. 100. Par contre,

à séparer l'hémolysine de la toxine *perfringens* C de l'agent non hémolytique. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **132**, 1939, p. 210.

(23) Il y aurait lieu de comparer la valeur thérapeutique de ces sérums complexes avec celle des sérums obtenus en injectant seulement un ou deux antigènes essentiels de la toxine *perfringens* totale.

(24) BULL (C.) et PRITCHETT (I.). *J. exper. med.*, **26**, 1917, p. 867.

(25) KRUIF (P. DE), ADAMS (Th.) et IRELAND (P.). *J. infect. Diseases*, **21**, 1917, p. 588. — DALLING (T.) et ROSS (E.). *J. comp. path. a. ther.*, **51**, 1938, p. 235.

(26) NAGLER (F.). *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, **97**, 1940, p. 273.

(27) WALBUM (L. E.) et REYMANN (C. G.). *J. path. a. bact.*, **36**, 1933, p. 469.

différents auteurs ont employé diverses peptones (28) avec succès : ils sont ainsi arrivés, d'une part, à intensifier la toxinogénèse et, d'autre part, à en réduire les irrégularités ; mais, ils n'ont spécifié de résultats ni sur la constance des propriétés des toxines préparées dans les bouillons de viande additionnés de peptones, ni sur la valeur moyenne de la dose minima mortelle des toxines précipitées dans de tels bouillons.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, la D. M. M. moyenne des échantillons de toxine précipitée que nous préparons à partir du bouillon Vf est de 0 milligr. 08 avant toute purification (moyenne de 58 préparations). Etant donné que beaucoup d'entre eux doivent servir à l'immunisation des chevaux par l'excellent procédé de l'enrobement de l'antigène dans la lanoline, mis en œuvre par G. Ramon et ses collaborateurs au cours de leurs recherches sur l'immunisation antitétanique et antidiphthérique (29), et que la toxine doit être dissoute dans le plus petit volume possible de culture avant de l'englober dans cette graisse (30), il est nécessaire d'avoir des échantillons de toxine dont la D. M. M. se présente sous un faible poids (31), ce qui dispense de faire des purifications

(28) WALBUM et REYMANN emploient la peptone Riedel ; BORTHWICK (G. R.) utilise la peptone Fresne (*British Journ. of exp. path.*, **18**, 1937, p. 475 à 481) ; STEWART (S. E.) la peptone Bacto (d'après cet auteur, suivant les peptones ajoutées au bouillon de bœuf, la production de l'hémotoxine est favorisée ou entravée). Signalons aussi que, d'après BORTHWICK, l'emploi de viande fraîche et d'extrait de viande élimine presque les fluctuations dans la production de la toxine *perfringens*.

(29) RAMON (G.), LEMETAYER (E.) et RICHOU (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 1027 ; *Ibid.*, **116**, p. 823 ; *Revue d'Immunologie*, **1**, 1935, p. 199 ; RAMON (G.) et LEMETAYER (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 248 ; RAMON (G.), LEMETAYER (E.) et RICHOU (R.). *Revue d'Immunologie*, **3**, 1937, p. 202 ; RAMON (G.), LEMETAYER (E.), RICHOU (R.) et NICOL (L.). *Ibid.*, **3**, p. 285.

(30) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 1224 ; *Ibid.*, **124**, 1937, p. 518 ; *Revue d'Immunologie*, **3**, 1937, p. 485.

(31) NESTORESICO (N.) et THEODORESICO (B.) [*C. R. Soc. de Biol.*, **133**, 1940, p. 743] n'ont pu mener à bien l'immunisation de leurs chevaux en utilisant des toxines *perfringens* précipitées dont les doses minima mortelles, pour la souris, étaient de 1 milligr. 5 à 2 milligr. 5 ; avec ces toxines, ils ont provoqué la mort de 14 chevaux sur 18.

Les toxines précipitées contiennent non seulement les antigènes spécifiques élaborés dans le bouillon par le *B. perfringens*, mais encore les substances du bouillon précipitables par le sulfate d'ammonium.

et d'éviter ainsi des pertes inévitables de toxine. Aussi, avant de rechercher parmi les peptones complexes celle qu'il est préférable d'ajouter au bouillon Vf pour accroître la production de la toxine *perfringens*, avons-nous d'abord essayé de déterminer si l'addition à ce bouillon de substances-tampons simples ou de composés cristallisés à propriétés oxydo-réductrices intenses ne favoriserait pas la toxinogénèse. (Au cours de ces recherches préliminaires, nous n'avons pas déterminé l'activité hémolytique, mais seulement la toxicité des cultures centrifugées.) Mais, après avoir constitué une réserve suffisante de toxines précipitées, nous avons ensuite étudié la toxicité et l'activité hémolytique des cultures effectuées comparativement dans des bouillons Vf additionnés de différentes peptones. Dans le chapitre suivant nous exposerons les résultats de ces recherches successives.

#### IV. — Recherches pour augmenter la production de la toxine *perfringens*.

##### A. — TOXINOGENÈSE EN PRÉSENCE DE PYRUVATE DE SOUDE ET DE PHOSPHATE BIPOTASSIQUE.

Dans une première série d'expériences nous avons déterminé, comparativement, la quantité de toxine formée dans le bouillon Vf habituel glucosé à 1 p. 1.000 (pH 7,7-7,8) et dans le même bouillon additionné, par litre, aussitôt après l'ensemencement, d'une solution-tampon (32) stérile, fraîchement

La faible valeur de la D. M. M. de nos échantillons de toxine (en moyenne 0 milligr. 08) indique que ceux-ci contiennent beaucoup moins d'éléments non spécifiques, provenant du bouillon, que les toxines de Nestoresco et Theodoresco.

(32) BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et M<sup>lle</sup> AMOUREUX, en 1927, ont amélioré la production de la toxine tétanique en ajoutant du phosphate monopotassique et du pyruvate de soude à un bouillon de rate. Ces *Annales*, **41**, 1927, p. 83. — PRÉVOT (A. R.) [*C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 1254] a obtenu des toxines tétaniques de titre élevé en ajoutant le même mélange à une digestion chlorhydrique de viande et de foie de bœuf préparée à peu de chose près comme le bouillon Vf.

Dans nos expériences, pour 1 litre de bouillon Vf, nous préparons le mélange suivant : pyruvate de soude : 2 grammes ;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  : 5 ou



préparée, contenant 2 grammes de pyruvate de soude et 5 ou 8 grammes de phosphate bipotassique (avant l'ensemencement les bouillons sont privés d'air par un chauffage à 100° : ils sont ensuite ensemencés avec le même volume d'une culture jeune de *B. perfringens* réalisée dans un seul tube).

Nous indiquons dans le tableau suivant (tableau XV) les résultats de 7 expériences : les quantités de bouillon ensemencées, le pH des cultures centrifugées après vingt-deux heures d'étuve à 35° et le nombre de D. M. M. contenues dans 1 cent. cube de la toxine centrifugée. Les chiffres donnés montrent, d'une part, que les toxines préparées dans les bouillons additionnés de tampon sont moins acides, vingt-

TABLEAU XV. — Toxicité après vingt-deux heures d'étuve à 35° des cultures de *B. perfringens* (souche Lechien) effectuées dans du bouillon Vf ordinaire ou dans du bouillon Vf tamponné.

DATE des expériences	VOLUME du bouillon ensemencé	CULTURES en bouillon Vf ordinaire		CULTURES en bouillon Vf tamponné	
		pH de la toxine centrifugée	Titre de la toxine centrifugée (D. M. M. par centimètre cube)	pH de la toxine centrifugée	Titre de la toxine centrifugée (D. M. M. par centimètre cube)
6 avril 1939 . . .	40 c.c. par tube.	5,4	30	5,8	40
15 mai 1939. . . .	40 c.c. par tube.	5,6	10-20	6,4	20-30
6 avril 1939 . . .	40 c.c. par tube.	5,4	20-25	6,1-6,2	25
12 septembre 1939 .	40 c.c. par tube.	6,3	15	6,7	20
4 septembre 1939 .	4 l. par flacon.	6,9	20	7	25-30
31 août 1939 . . . .	4 l. par flacon.	6,4	15	6,8	20-25
7 septembre 1939 .	4 l. par flacon.	6,3	20-25	6,6	20-25

deux heures après l'ensemencement, que les toxines préparées dans les bouillons Vf ordinaires et, d'autre part, que la quantité de toxine présente dans les bouillons tamponnés, après vingt-deux heures d'étuve à 35°, est égale ou supérieure à celle qui existe au bout du même temps dans les

8 grammes ; eau : 30 cent. cubes. Nous stérilisons cette solution par chauffage à 110° ou, plutôt, par filtration sur bougie. Signalons que tous les échantillons de pyruvate de soude que nous avons utilisés ont présenté une réaction acide (pH d'une solution à 1 p. 100 : 6,2-6,3).

bouillons sans tampon. Le bouillon Vf additionné, par litre, de 5 ou 8 grammes de phosphate bipotassique et de 2 grammes de pyruvate de soude, ne contient donc pas toujours, dans les conditions indiquées, une quantité plus grande de toxine *perfringens* que le bouillon Vf ordinaire. L'ensemble de nos titrages indique que dans 5 cas sur 14 le bouillon Vf est aussi favorable à la production de la toxine *perfringens* que le bouillon Vf tamponné.

Mais, étant donné que le début de la culture est souvent plus précoce dans les bouillons tamponnés que dans les autres et que, suivant une notion courante, la toxine *perfringens* une fois produite s'atténue rapidement à l'étuve, il y avait lieu de se demander si des phénomènes prolongés d'atténuation, dans des cultures particulièrement hâtives, n'avaient pas masqué, au cours de nos expériences, l'effet favorisant du tampon. Si tel était le cas, les résultats de nos déterminations effectuées très tardivement (après vingt-deux heures d'étuve à 35°) ne représenteraient pas la quantité maxima de toxine élaborée dans les bouillons tamponnés. Afin d'élucider ce point, nous avons évalué au bout de quatorze, dix-huit et vingt-deux heures d'étuve à 35° la toxicité des cultures en bouillon tamponné et celle des cultures en bouillon non tamponné ; en outre, pour rendre cette étude plus complète, nous avons fait les mêmes séries d'expériences à la température de 30°. Au cours de ces recherches, nous avons ensemencé des tubes droits de même verre, bouchés au coton, contenant, soit 40 cent. cubes de bouillon Vf stérile non tamponné, soit 40 cent. cubes du même bouillon additionné, par litre, de la solution-tampon indiquée précédemment (33). La moitié des tubes est placée dans un thermostat à 30°, l'autre moitié à 35°. Quatorze heures après l'ensemencement, nous sortons deux tubes des étuves à 30° et à 35°. Nous centrifugeons les cultures et déterminons aussitôt le titre de la toxine ainsi centrifugée après quatorze heures

(33) Avant l'ensemencement, les tubes sont préalablement maintenus pendant trente minutes au moins dans un bain-marie bouillant, refroidis rapidement à 30° et 35°, puis ensemencés avec une culture, en tube scellé, de notre souche habituelle de *B. perfringens*. Pour homogénéiser la semence, le tube scellé est agité avant d'être ouvert.

d'étuve. Nous procédons de même dix-huit, vingt-deux et vingt-quatre heures après l'ensemencement.

Ces expériences, réalisées dans le but de rechercher si, au cours de l'incubation, les bouillons tamponnés contiennent plus de toxine *perfringens* que les bouillons non tamponnés, nous ont permis en même temps de comparer la vitesse de formation de la toxine *perfringens* à 30° et à 35° dans des bouillons Vf de valeur nutritive inégale (34). [Tous ces bouillons sont ajustés à pH 7.7-7.8 puis glucosés à 1 p. 1.000 avant de les stériliser.]

VITESSE ET INTENSITÉ DE LA TOXINOGENÈSE AUX TEMPÉRATURES DE 30° ET 35°. — a) *Dans les bouillons Vf ordinaires.* — 1° Bouillon Vf peu nutritif : Nous avons déterminé, après quatorze, dix-huit, vingt-deux et vingt-quatre heures d'étuve, la toxicité des cultures *perfringens* maintenues à 30° ou à 35°. Dans les essais à 30° (3 expériences), la toxicité maxima a été observée au bout de dix-huit heures d'étuve dans deux expériences et dans trois autres expériences après vingt-deux heures d'étuve ; dans le cas des cultures maintenues à 35° (4 expériences), le maximum de toxicité a eu lieu dans trois expériences au bout de dix-huit heures d'étuve et dans une expérience au bout de vingt-deux heures. Ces chiffres indiquent que la vitesse de formation de la toxine est un peu plus rapide à 35° qu'à 30°. Le maximum de toxicité des cultures dans le bouillon Vf semble se produire après 20-22 heures d'étuve à 30° et, environ, après 18-20 heures à 35°. La toxicité maxima observée dans ces expériences a été de 15 D. M. M. par centimètre cube, que les cultures aient été réalisées à 30° ou à 35°.

(34) Nous considérons comme bouillon peu nutritif pour le *B. perfringens* un bouillon dans lequel les quantités de toxine formées sont inférieures ou au plus égales à 25 doses mortelles par centimètre cube.

Signalons que nous avons observé à plusieurs reprises que des bouillons qui ne permettaient pas d'obtenir des toxines *perfringens* de titre élevé, convenaient parfaitement à la préparation des toxines vibrion septique, histolytique ou œdematiens. Ainsi, à partir du bouillon préparé le 2 novembre 1939 nous avons obtenu une toxine *perfringens* contenant seulement 10 doses mortelles par centimètre cube et, par contre, une toxine vibrion septique titrant 200 à 300 doses mortelles par centimètre cube.



L'examen de l'ensemble de nos déterminations indique en outre que, dans les expériences où le maximum de toxicité a été observé au bout de dix-huit heures d'étuve, la toxine formée ne s'atténue sensiblement pas, en général, entre la dix-huitième et la vingt-deuxième heure d'étuve. De sorte que, d'après les résultats de ces expériences, effectuées sur de petites quantités de bouillon (40 cent. cubes par tube), on peut déduire que la préparation de la toxine *perfringens* (à partir du *B. perfringens* A, souche Lechien) dans des bouillons Vf de valeur nutritive moyenne, peut être réalisée indifféremment à 30° ou à 35°, et la centrifugation effectuée après vingt à vingt-deux heures d'étuve.

Nous avons vérifié cette observation sur des quantités plus grandes de bouillon Vf. Nous avonsensemencé des flacons de 5 litres en verre pyrex, contenant 4 litres de bouillon. Les uns ont été placés à 30°, les autres à 35°. Au bout de vingt heures d'étuve, nous avons déterminé la toxicité des cultures centrifugées.

Dans l'expérience I du tableau XVI, le titre de la toxine préparée à 30° a été de 20 D. M. M. par centimètre cube ; le titre de celle qui a été obtenue à 35° a été de 25 D. M. M.

TABLEAU XVI. — Toxicité après vingt heures d'étuve des cultures de *B. perfringens* (souche Lechien) effectuées comparativement à 30°, 33-34°, 35° dans du bouillon Vf ordinaire.

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	VOLUME ensemencé en litres	TITRE DE LA TOXINE CENTRIFUGÉE (D. M. par centimètre cube)		
		Cultures à 30°	Cultures à 33-34°	Cultures à 35°
I (18 juillet 1939) . . . .	4 par flacon.	20		25
II (2 octobre 1939) . . . .	4 par flacon.	20		20
III (26 octobre 1939) . . . .	4 par flacon.	15-20		15-20
IV (12 octobre 1939) . . . .	4 par flacon.	40-50	50	
V (18 octobre 1939) . . . .	4 par flacon.	40	40	
VI (7 décembre 1939) . . . .	4 par flacon.	50-60	40	

Dans l'expérience II du même tableau, le titre des deux toxines a été de 20 D. M. M. par centimètre cube et, dans l'expérience III, de 15 à 20 D. M. M.

2° Bouillon très nutritif : Au cours de deux expériences, effectuées avec des bouillons Vf particulièrement propres à la nutrition du *B. perfringens*, nous avons constaté que ce bacille élabore très rapidement sa toxine. Nous avons en effet obtenu à 30°, après quatorze heures d'étuve seulement, des cultures très toxiques : elles contenaient, après centrifugation, 35 D. M. M. par centimètre cube ; après vingt-deux heures d'étuve, leur toxicité était moindre : elles ne titraient plus que 25 à 30 D. M. M. par centimètre cube (expérience du 18 septembre 1939, tableau XVII). Ces chiffres nous ont montré qu'il serait désirable de faire systématiquement, au cours de l'incubation, dans les bouillons où évolue le développement du *B. perfringens*, des déterminations précoces et fréquentes de la toxicité, afin de déterminer sur un grand nombre d'échantillons la vitesse de formation de la toxine et l'intensité des phénomènes d'atténuation qui surviennent ensuite. Nous avons réalisé un tel essai le 17 avril 1940 : nous avons réparti le bouillon, comme d'habitude, par quantités de 40 cent. cubes dans des tubes droits. Dans la moitié de ceux-ci nous avons mis 60 milligrammes de sang desséché (1,5 p. 1.000). Après stérilisation, nous les avons tous ensemencés avec 0 c. c. 5 d'une culture de vingt-quatre heures de *B. perfringens*. Les résultats de cette expérience, rapportés dans le tableau XVII, montrent que la toxine centrifugée, préparée à partir du bouillon ordinaire, contient :

	DOSES minima mortelles par centimètre cube
Après six heures d'étuve à 30° . . . . .	2 à 5
Après dix heures d'étuve à 30° . . . . .	20
Après quatorze heures d'étuve à 30° . . . . .	30
Après dix-huit et vingt et une heures d'étuve à 30° . . . . .	25

La toxine préparée à partir du bouillon additionné de 1.5 p. 1.000 de sang desséché contient :

	DOSES minima mortelles par centimètre cube
Après six heures d'étuve à 30° . . . . .	5 à 10
Après dix heures d'étuve à 30° . . . . .	25
Après quatorze heures d'étuve à 30° . . . . .	35
Après vingt et une heures d'étuve à 30° . . . . .	30 à 35

Dans cette expérience, les cultures titrées après dix heures d'étuve sont moins toxiques que les cultures centrifugées quatorze heures après l'ensemencement et, comme dans l'expérience précédente, la toxicité est plus élevée après quatorze heures d'étuve qu'après vingt et une ou vingt-deux heures.

Parallèlement aux évaluations de la toxicité, il faudrait, pour déceler les différences biochimiques qui existent entre de nombreux bouillons très inégalement nutritifs, rechercher les vitamines, doser le fer, le cuivre, titrer l'azote sous ses différentes formes (acides aminés, diaminés, polypeptides). En rapprochant les résultats des investigations chimiques de ceux des déterminations de la toxicité, peut-être parviendrait-on à fixer une relation entre la durée optima d'incubation qu'il convient d'adopter pour obtenir la quantité maxima de toxine *perfringens* dans un bouillon donné, que l'on aurait préalablement analysé chimiquement et amélioré en augmentant la proportion des éléments en faible quantité. Lorsque nous avons obtenu, après vingt heures d'étuve à 30° ou à 33°-34°, des toxines titrant 40 à 60 doses mortelles par centimètre cube (expériences IV, V et VI du tableau XVI), nous avons vraisemblablement des toxines d'un titre plus élevé au bout d'un temps d'incubation plus court. Mais les circonstances actuelles ne nous ont pas permis de faire simultanément l'analyse chimique complète de ces différents bouillons et les déterminations de la toxicité des cultures au cours de l'incubation (35). A l'avenir, il serait intéressant d'étudier aussi par la méthode extrêmement rapide de la floculation mise au point par G. Ramon (36), les variations de la valeur antigène des cultures pendant la période de développement intense des bacilles ainsi que pendant la phase d'atténuation progressive de la toxicité.

b) *Dans les bouillons V<sub>f</sub> tamponnés, peu nutritifs.* — Ainsi que nous l'avons dit précédemment, nous avons déterminé

(35) Nous avons seulement déterminé, avant l'ensemencement, l'extrait sec et l'azote aminé de 8 bouillons et, vingt-deux heures après l'ensemencement, le titre des toxines *perfringens* obtenues. Les résultats de ces quelques investigations chimiques ne nous ont pas toujours permis de prévoir dans quels bouillons les meilleures toxines seraient élaborées.

(36) RAMON (G.). *Revue d'Immunologie*, 6, 1940, p. 65.

après quatorze, dix-huit et vingt-deux heures d'étuve, non seulement la quantité de toxine que le *B. perfringens* élabore dans le bouillon VI ordinaire, mais aussi celle qui se forme dans le bouillon additionné de phosphate bipotassique et de pyruvate de soude (rappelons que, dans toutes ces expériences, le bouillon VI est réparti par quantités de 40 cent. cubes dans des tubes droits, bouchés au coton).

La toxicité la plus élevée a été observée, à 30°, au bout de quatorze heures dans deux expériences, au bout de dix-huit heures dans une autre et, à 35°, après quatorze heures d'étuve (3 expériences). Les quantités maxima de toxine obtenues ont été sensiblement les mêmes à 30° et à 35° : 20 à 25 D. M. M. de toxine par centimètre cube. Ainsi, dans l'expérience du 12 septembre, le titre de la toxine préparée à 35° a été de 20 à 25 D. M. M. par centimètre cube après quatorze heures d'étuve, et celui de la toxine formée à 30°, de 20 D. M. M. par centimètre cube au bout de quatorze heures également (voir tableau XVII).

Nos déterminations montrent aussi que dans les bouillons tamponnés ayant rapidement atteint une toxicité élevée (en quatorze heures) les phénomènes d'atténuation, généralement nets à 35° et même à 30° entre la quatorzième et la dix-huitième heure d'étuve, ne s'accroissent pas entre la dix-huitième et la vingt-deuxième heure d'étuve ; dans l'expérience du 15 juin par exemple, réalisée à 30°, les cultures centrifugées après vingt-deux heures d'étuve, moins toxiques que les cultures centrifugées après quatorze heures d'étuve, ont la même toxicité que les cultures centrifugées après dix-huit heures : elles contiennent 15 D. M. M. par centimètre cube.

Nous avons fait la même observation dans l'expérience du 18 septembre, réalisée à 30° avec un bouillon très nutritif : la toxicité observée dans cette expérience après quatorze heures d'étuve a été de 45 à 50 D. M. M. par centimètre cube, puis le titre de la toxine, plus faible après dix-huit heures qu'après quatorze heures, s'est stabilisé à 40 D. M. M. par centimètre cube, valeur trouvée après dix-huit heures et vingt-deux heures d'étuve.

Il serait intéressant de suivre les variations du potentiel d'oxydo-réduction au cours des trois phases successives que



ces résultats mettent en évidence : 1° pendant la phase de développement intense au cours de laquelle la toxicité augmente ; 2° pendant la phase de diminution de la toxicité ; 3° pendant la période de stabilisation de la toxicité (37).

La rapidité avec laquelle la toxine apparaît dans les bouillons Vf très riches en éléments nutritifs incite à penser qu'il serait nécessaire de commencer déjà après huit, dix et douze heures d'étuve à 35° et à 30° les déterminations simultanées du potentiel d'oxydo-réduction, de la toxicité et de l'activité hémolytique dans de tels bouillons additionnés ou non de substances tampons.

INTENSITÉ COMPARÉE DE LA TOXINOGENÈSE, AU COURS DE L'INCUBATION, DANS LES BOUILLONS Vf ORDINAIRES ET DANS LES BOUILLONS Vf TAMPONNÉS. — a) *Bouillons peu nutritifs*. — Dans le tableau XVII nous indiquons les résultats de quelques-unes des expériences au cours desquelles nous avons suivi l'évolution de la toxinogenèse dans les bouillons tamponnés ou non, ensemencés dans les mêmes conditions. Les cultures effectuées à 30° (4 expériences) ou à 35° (2 expériences) sont centrifugées après quatorze, dix-huit et vingt-deux heures d'étuve. Le titre des toxines centrifugées est exprimé, comme toujours, en D. M. M. par centimètre cube.

En comparant le titre des toxines formées dans les bouillons Vf ordinaires et dans les bouillons Vf tamponnés, maintenus à 30°, nous avons constaté les résultats suivants : au bout de quatorze heures d'étuve, la toxicité des cultures en

(37) D'après PLOTZ et GELOSO, pendant la croissance des anaérobies, le potentiel du bouillon devient de plus en plus négatif, puis se fixe à la valeur de  $-0,265$  V (à 37° et pH 7,1), soit  $rH_2 = 5,5$ .

ORR et REED ont suivi à de courts intervalles les changements de potentiel qui se produisent pendant le développement du *B. perfringens* dans le milieu Robertson additionné ou non de quantités variables de cystéine ; ils ont constaté que dans les cultures sans cystéine le potentiel d'oxydo-réduction tombe brusquement dès le début de la culture, atteint une valeur minima vers la quatrième ou la cinquième heure, puis augmente et finalement se stabilise vers la treizième ou la quinzième heure. Dans les tubes contenant 0,2 p. 100 de cystéine, la chute de potentiel est retardée ; le minimum ne se produit que vers la septième heure. Le niveau auquel le potentiel se stabilise ensuite est voisin de celui des tubes sans cystéine.

bouillon Vf tamponné, dans nos quatre expériences, a été plus grande que celle des cultures en bouillon Vf ordinaire. Après dix-huit heures d'étuve, dans trois expériences sur

TABLEAU XVII. — Toxicité comparée des cultures de *B. perfringens* titrées au cours de l'incubation.

EXPÉRIENCE	TEMPÉRATURE en degrés	DURÉE d'incubation en heures	CULTURES en bouillon Vf ordinaire Titre de la toxine centrifugée (D. M. par centimètre cube)	CULTURES en bouillon Vf tamponné Titre de la toxine centrifugée (D. M. par centimètre cube)
12 septembre 1939 .	35	14	10-15	20-25
		18	15-20	20
		22	15	20
15 juin 1939 . . . .	35	14	10	20
		18	10	15
		22	15	15
12 septembre 1939 .	30	14	10-15	20
		18	15	15-20
		22	15-20	15-20
18 septembre 1939 .	30	14	35	45-50
		18	25-30	40
		22	25-30	40
17 avril 1940 . . . .	30	6	2 à 5	
		10	20	
		14	30	
		18 et 21	25	

quatre, les cultures en bouillon Vf tamponné sont beaucoup plus toxiques que les cultures en bouillon Vf ordinaire. Dans deux expériences seulement (sur quatre), les cultures en bouillon tamponné sont nettement plus toxiques au bout de vingt-deux heures que les cultures en bouillon Vf non tamponné ; dans les deux autres expériences, le titre des toxines obtenues dans le bouillon Vf ordinaire est égal à celui des toxines obtenues en milieu tamponné.

Le titre maximum des toxines obtenues en bouillon Vf ordinaire au cours de l'ensemble des expériences réalisées à 30° a été de 15 D. M. M. par centimètre cube et à partir des mêmes bouillons additionnés de tampon, de 30 D. M. M. par centimètre cube.

Si nous examinons en détail les résultats d'une des expériences effectuées à 30°, celle du 15 juin par exemple, nous voyons que le bouillon Vf ordinaire contient 10 D. M. M. par centimètre cube au bout de quatorze et dix-huit heures d'étuve et 15 D. M. M. par centimètre cube au bout de vingt-deux heures, tandis que le bouillon Vf tamponné contient 20 D. M. M. au bout de quatorze heures d'étuve et seulement 15 après dix-huit et vingt-deux heures d'étuve. Ainsi, dans cette expérience, la toxicité des cultures en bouillon tamponné présente d'abord une valeur plus élevée que celle des cultures en bouillon Vf ordinaire, puis diminue et devient alors égale, au bout d'une incubation prolongée, à la toxicité des cultures en bouillon Vf ordinaire. Cette observation montre que *le phénomène de l'atténuation tardive de la toxine peut masquer l'effet favorisant du tampon*.

Dans les deux expériences réalisées à 33°, de même que dans celles que nous venons de rapporter, le titre des toxines préparées à partir des bouillons Vf tamponnés est supérieur ou égal, mais jamais inférieur, à celui des toxines préparées avec le bouillon Vf ordinaire. Voici les résultats observés dans ces deux expériences :

	BOUILLON ordinaire	BOUILLON tamponné
<i>Première expérience :</i>		
Titre de la toxine après quatorze heures d'étuve. .	10-15	20
Titre de la toxine après dix-huit heures d'étuve. .	15	15
Titre de la toxine après vingt-deux heures d'étuve.	10-15	15
<i>Deuxième expérience :</i>		
Titre de la toxine après quatorze heures d'étuve .	10-15	20-25
Titre de la toxine après dix-huit heures d'étuve .	15-20	20
Titre de la toxine après vingt-deux heures d'étuve.	15	20

b) *Bouillons très nutritifs*. — Nous n'avons déterminé que dans une seule expérience la quantité de toxine présente après quatorze, dix-huit et vingt-deux heures d'étuve à 30° dans un bouillon Vf plus nutritif que les bouillons utilisés au cours des essais précédents. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau XVII (expérience du 18 septembre). Ils indiquent que *le titre de la toxine formée dans le bouillon tamponné est toujours supérieur à celui de la toxine existant au même moment dans le bouillon sans*

*tampon*. Ainsi, quatorze heures après l'ensemencement, le bouillon Vf ordinaire contient 35 D. M. M. de toxine par centimètre cube et le bouillon tamponné 45 à 50. Après dix-huit et vingt-deux heures d'étuve, le titre de la toxine dans le bouillon Vf est de 25 à 30 D. M. M. et le titre de la toxine dans le bouillon tamponné est de 40 D. M. M. par centimètre cube. Faisons remarquer en passant que les résultats de cette expérience montrent que la toxicité est plus faible après dix-huit heures d'étuve qu'après quatorze heures et que la diminution de toxicité est relativement moins prononcée dans le bouillon tamponné que dans le bouillon Vf ordinaire.

Les résultats que nous venons de rapporter indiquent que dans un bouillon déjà très favorable à la fonction toxigène du *B. perfringens* le phosphate bipotassique et le pyruvate de soude intensifient encore la valeur nutritive de ce bouillon. Il serait intéressant de rechercher si le mélange phosphate-pyruvate renforcerait encore la toxinogenèse dans des bouillons Vf aussi nutritifs que ceux qui nous ont permis d'obtenir, en l'absence de substances tampons, des toxines contenant 40, 45 et même 50 à 60 doses mortelles par centimètre cube.

#### B. — TOXINOGENÈSE EN PRÉSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C).

Les expériences de Kliger et Guggenheim (38) ont montré que l'acide ascorbique, en raison de ses propriétés réductrices, influence à tel point le potentiel d'oxydo-réduction des milieux nutritifs qu'il permet le développement du *B. perfringens* en présence de l'oxygène de l'air. Patocka et Ilavsky (39) ont confirmé ces faits dans une série de recherches au cours desquelles ils ont déterminé les valeurs du potentiel d'oxydo-réduction des bouillons ordinaires et des mêmes bouillons additionnés soit de glucose, soit de cystine, soit d'acide ascorbique. J. Catz (40) a constaté également que, dans les bouillons ordinaires non privés d'air mais contenant

(38) KLIGER (I. J.) et GUGGENHEIM (K.). *J. Bact.*, **35**, 1938, p. 141.

(39) PATOCKA (F.) et ILAVSKY (J.). *Ces Annales*, **62**, 1939, p. 296-315.

(40) CATZ (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 516.



de l'acide ascorbique, on peut obtenir des cultures abondantes de *B. perfringens*. Mais aucun de ces expérimentateurs n'a déterminé la quantité de toxine *perfringens* formée dans les bouillons avec ou sans acide ascorbique. Il n'est pas évident que cette vitamine intensifie la toxinogénèse. D'après les expériences de Patocka et Ilavsky, elle augmente la formation de la toxine tétanique ; d'après celles de Jungeblut, de Kliger, Guggenheim et Warburg, elle exerce, par contre, une action nocive sur cette toxine (41) ; elle atténue aussi la toxine diphtérique (42) dans les expériences de Harde et Philippe, de Jungeblut et Zwemer.

Büller Souto et Lima (43) ont bien constaté que la vitamine C ajoutée à une solution de toxine *perfringens* ne neutralise pas cette toxine ; mais ils n'ont pas étudié comparativement la production de la toxine *perfringens* dans les milieux nutritifs additionnés ou non d'acide ascorbique.

Dans nos expériences, nous avons déterminé la toxicité des cultures effectuées dans du bouillon Vfensemencé avec une culture de seize à dix-huit heures de *B. perfringens* (souche Lechien) et celle des cultures obtenues dans le même bouillon (44) additionné, aussitôt après l'ensemencement, d'une solution d'acide ascorbique filtrée sur bougie stérile. (Par litre de bouillon, nous ajoutons 15 cent. cubes ou 25 cent. cubes d'une solution d'acide ascorbique à 1 p. 100, c'est-à-dire 0 gr. 15 ou 0 gr. 25 de vitamine.) Nous préparons cette solution juste avant l'ensemencement. Nous avons effectué deux essais à 35°

(41) JUNGBLUT (Claus W.). *J. Immunol.*, **33**, 1937, p. 203 à 214 ; KLIGER (I. J.), GUGGENHEIM (K.) et WARBURG (F. M.). *J. Path. a. Bact.*, **46**, 1938, p. 619.

(42) HARDE (Edna). *C. R. Acad. des Sc.*, **199**, 1934, p. 618 ; HARDE (Edna) et PHILIPPE (Marcel). *C. R. Acad. des Sc.*, **199**, 1934, p. 738 ; JUNGBLUT (Claus W.) et ZWEMER (Raymond L.). *Proceed. of soc. f. exp. Biol. a. Med.*, **32**, 1934, p. 1229 à 1234.

(43) SOUTO (A. Buller) et LIMA (C.). *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, 1938, p. 767.

(44) Tous ces essais sont faits dans des tubes droits (bouchés au coton) contenant 40 cent. cubes de bouillon Vf glucosé à 1 p. 1.000, pH 7,7-7,8. Avant l'ensemencement, le bouillon est privé d'air par un chauffage de trente-cinq minutes dans un bain-marie bouillant ; les tubes sont rapidement amenés à la température de 30° ou 35° puis ensemencés.

et un à 30°. Dans les 3 cas, nous avons constaté que le début de la culture est plus rapide dans le bouillon avec acide ascorbique que dans le bouillon Vf ordinaire. Dans les expériences à 35° nous avons déterminé la toxicité des cultures au bout de vingt-deux heures et, dans l'expérience à 30°, au bout de dix-huit et vingt-deux heures. En comparant la toxicité des cultures obtenues dans les bouillons avec ou sans acide ascorbique, centrifugées après vingt-deux heures d'étuve à 35°, nous avons constaté que l'acide ascorbique n'a pas influencé la toxinogénèse dans un cas et l'a augmentée dans un autre. Dans ce dernier cas, nous avons obtenu dans le bouillon Vf, 10 à 15 D. M. M. de toxine par centimètre cube et, dans le bouillon avec acide ascorbique, 20 D. M. M. par centimètre cube.

Dans l'expérience effectuée à 30°, l'acide ascorbique a favorisé la toxinogénèse. Voici nos résultats :

	D. M. par centimètre cube
Après 18 heures d'étuve, titre de la toxine en bouillon Vf. . .	10 à 15
Après 18 heures d'étuve, titre de la toxine en bouillon Vf + acide ascorbique. . . . .	20 à 25
Après 22 heures d'étuve, titre de la toxine en bouillon Vf. . .	15
Après 22 heures d'étuve, titre de la toxine en bouillon Vf + acide ascorbique. . . . .	20

Ainsi, dans 3 cas sur 4, nous avons constaté que l'acide ascorbique augmente la production de la toxine *perfringens* dans le bouillon Vf.

#### C. — TOXINOGENÈSE DANS LE BOUILLON Vf ADDITIONNÉ DE PEPTONES COMMERCIALES.

Le bouillon Vf de Weinberg et Goy, voisin de celui de Stickel et Meyer, est, rappelons-le, un milieu riche en peptones résultant de la digestion pepsique de muscles et de foie de bœuf (45). Nous avons recherché si les peptones Chapo-

(45) Voici, tel qu'il est régulièrement réalisé au laboratoire depuis plusieurs années, le mode de préparation et d'alcalinisation du bouillon Vf, bien trop sommairement décrit à la page 47 du traité *Les*

teaut, Vaillant PBC, Defresne et Witte amélioreraient la valeur nutritive de ce bouillon. Rappelons que la peptone Vaillant PBC est une digestion pepsique et la peptone Defresne une digestion pancréatique de viande de cheval.

Pour réaliser ces essais nous avons procédé ainsi : du bouillon Vf, pH 7,7-7,8, glucosé à 1 p. 1.000, est réparti en flacons de 5 litres en verre pyrex et stérilisé. Deux de ces flacons sont conservés comme témoins. Dans les autres nous ajoutons : 1 gramme par litre de peptone Vaillant, Defresne ou Witte, ou : 1 gramme, 5 grammes ou 10 grammes par litre de peptone Chapoteaut. Les différents bouillons sont réajustés à pH 7,7-7,8 et tous les flacons sont stérilisés.

Nous les ensemençons ensuite avec une culture de dix-huit heures de *B. perfringens* effectuée dans du bouillon Vf ordinaire glucosé à 1 p. 1.000 ; vingt et une heures après l'ensemencement nous centrifugeons les cultures. La détermination de la toxicité est faite aussitôt après la centrifugation.

L'examen du tableau XVIII indique que la peptone Vaillant PBC améliore nettement la production de la toxine *perfringens* dans les bouillons Vf peu ou moyennement nutritifs

*microbes anaérobies* de MM. WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. (Masson, éditeur, Paris, 1937.)

*Préparation du bouillon.* Dans une cuve en porcelaine, placée dans un grand bain-marie muni d'un régulateur, on introduit 20 litres d'eau. On élève la température à 50° ; on ajoute :

4 kilogrammes de muscles de bœuf, passés au broyeur électrique ; 1 kilogr. 350 de foie de bœuf, passé au broyeur électrique ; 200 cent. cubes d'acide chlorhydrique pur et concentré ( $d = 1,19$ ). On agite ; on règle la température à l'intérieur de la cuve à 48° ; on met aussitôt 15 grammes de pepsine en poudre (titre 500) et on maintient la digestion à 48° pendant vingt-trois heures. Au bout de ce temps, celle-ci est arrêtée par un chauffage rapide à 80°. Puis le bouillon est filtré sans retard ; une partie est alors stérilisée à 100° pendant vingt-cinq minutes et *conservée à l'état acide*, l'autre partie est *alcalinisée* pendant que la température est encore de 60°-70°.

*Alcalinisation du bouillon.* L'alcalinisation jusqu'au pH voulu est réalisée par addition de lessive de soude concentrée ( $d = 1,33$ , 36° B). Un précipité floconneux et abondant apparaît. (La température du bouillon est de 60° environ.) Le bouillon alcalinisé est autoclavé pendant quinze minutes à 100°, puis filtré. Suivant l'usage auquel il est destiné, il est alors additionné ou non de glucose ; après stérilisation à 110° pendant vingt-cinq à trente minutes, il est prêt pour l'ensemencement.

TABLEAU XVIII. — Titre de la toxine *perfringens* préparée dans des bouillons Vf additionnés de diverses peptones.

NATURE DU BOUILLON	TITRE DE LA TOXINE PERFRINGENS				
	Expérience I	Expérience II	Expérience III	Expérience IV	Expérience V
Bouillon Vf ordinaire	5	15	25-30	35	20-30
Bouillon Vf } + 1 p. 1.000 de peptone Chapoteaut	10	10-15			
Bouillon Vf } + 5 p. 1.000 de peptone Chapoteaut	30				
Bouillon Vf } + 10 p. 1.000 de peptone Chapoteaut	20-30	20-25		30	30-40
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de peptone Vaillant PBC.	40				
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de peptone Defresne.			35	40	40-50
Bouillon Vf + 1 p. 1.000 de peptone Witte.			25	30-35	30-40

(expériences I, II et V) et n'influence pas la toxinogénèse dans les bouillons favorables par eux-mêmes au développement du bacille (expérience IV) ; la peptone Chapoteaut augmente la valeur nutritive du bouillon employé dans l'expérience I et ne change pas celle du bouillon de l'expérience II ; la peptone de Witte accentue la toxinogénèse dans l'expérience V et ne modifie pas la valeur des bouillonsensemencés dans les expériences III et IV ; la peptone Defresne a une très légère influence favorable dans l'expérience IV et une action favorisante marquée dans les expériences III et IV. Ainsi dans l'expérience IV le titre de la toxine préparée dans le bouillon Vf ordinaire est de 20 à 30 doses mortelles par centimètre cube et celui de la toxine préparée dans le bouillon additionné de peptone Defresne, de 40 à 50 doses mortelles par centimètre cube.

En résumé, l'addition de 1 gramme par litre de peptone Vaillant, Defresne ou Witte à un bouillon Vf très propice au développement du *B. perfringens* n'augmente pas la production de la toxine *perfringens* (expérience IV) ; mais cette quantité de peptone améliore nettement la valeur des bouillons moins nutritifs que nous avons essayés au cours de plusieurs autres expériences.

Des résultats de l'expérience I montrant que la toxinoge-



nèse est plus intense dans les bouillons additionnés de 5 p. 1.000 de peptone Chapoteaut que dans les bouillons contenant seulement 1 gramme par litre de cette peptone, il ressort qu'il faudrait rechercher la concentration optima de peptone qu'il est nécessaire d'employer pour préparer les quantités maxima de toxine *perfringens* dans le bouillon Vf.

### Résumé et conclusions.

#### PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE PERFRINGENS.

##### EFFET HÉMOLYTIQUE.

1° La toxine *perfringens* préparée dans le bouillon Vf ordinaire ou dans le bouillon Vf additionné de différentes peptones (Defresne, Vaillant, Chapoteaut, Witte) est très hémolytique. La plus petite quantité qui hémolyse 0 c. c. 1 de globules de mouton à 5 p. 100 varie, d'une expérience à l'autre, entre 0 c. c. 0003 et 0 c. c. 001.

La cystéine, ajoutée au bouillon Vf aux doses de 0,25 à 1 p. 100, n'empêche pas l'élaboration des agents toxiques et hémolytiques du *B. perfringens* type A, souche Lechien.

Ajoutée à de la toxine *perfringens* liquide qui s'est considérablement atténuée au cours du vieillissement, la cystéine rétablit généralement l'activité hémolytique initiale.

2° La dose minima hémolytique de nos échantillons de toxine *précipitée* récemment préparés varie entre 0 milligr. 0004 et 0 milligr. 002 (tableau XI).

L'activité hémolytique de tous les échantillons de toxine *perfringens* précipitée, conservés à l'état sec et en ampoules scellées sous le vide, ne reste pas stable à 2°.

3° Le titre hémolytique d'un échantillon de toxine, c'est-à-dire le poids de toxine que neutralise 1/10 d'unité d'un sérum étalon, peut varier avec le sérum étalon employé pour faire la détermination.

Exemple : le titre hémolytique de la toxine E 32 est de 0 milligr. 02 ou de 0 milligr. 045 suivant que le dosage *in vitro* est fait avec le sérum étalon danois ou avec le sérum étalon français. (Rappelons que le chiffre déterminé avec le sérum étalon danois indique le poids de toxine que nous utilisons ultérieurement pour évaluer, vis-à-vis de cette toxine, le titre anti-hémolytique des sérums anti-*perfringens* à expertiser.)

En recherchant, vis-à-vis de plusieurs échantillons de toxine *perfringens*, le titre anti-hémolytique de trois sérums thérapeutiques, nous avons fait les remarques suivantes :

a) *Le titre anti-hémolytique des sérums anti-perfringens A peut dépendre de l'échantillon de toxine utilisé pour réaliser le titrage (tableau XIII).*

Cette donnée incite à penser que *nos échantillons de toxine perfringens A contiennent, à des taux variés, plusieurs substances à propriétés hémolytiques in vitro vis-à-vis des globules de mouton.*

b) Des sérums qui ont la même valeur antitoxique d'après les titrages *in vivo* réalisés avec le même échantillon de toxine, peuvent avoir, vis-à-vis de cet échantillon, des titres anti-hémolytiques très différents, ce qui montre que les déterminations *in vitro* du titre anti-hémolytique ne renseignent pas toujours sur la valeur antitoxique globale des sérums.

#### ACTION GÉLATINOLYTIQUE.

1° La toxine *perfringens* précipitée liquéfie la gélatine ; l'intensité de la liquéfaction à 38° augmente avec la quantité de toxine et la durée d'incubation.

2° En comparant à différents pH (6,1, 6,85, 7,25, 7,45) l'action gélatinolytique exercée par une « dose-test » de 4 échantillons de toxine *perfringens*, nous avons constaté que ces échantillons, à la dose employée, font subir à 2 cent. cubes de gélatine à 3 p. 100 en six heures à 38°, des transformations de même ordre, neutralisables, en effet, après addition de formol, par 0 c. c. 35 ou 0 c. c. 4 de NaOH N/10.

#### VITESSE DE FORMATION DE LA TOXINE PERFRINGENS DANS LE BOUILLON Vf ADDITIONNÉ OU NON DE SUBSTANCES-TAMPONS.

1° BOUILLONS FAIBLEMENT NUTRITIFS. — Ensemencés avec des cultures jeunes de *B. perfringens* A (souche Lechien), les bouillons Vf faiblement nutritifs atteignent leur maximum de toxicité, à 30°, au bout de 20-22 heures d'étuve, et, à 35°, au bout de 18-20 heures. Le phosphate bipotassique et le pyruvate de soude accélèrent l'élaboration de la toxine *perfringens* dans de tels bouillons : le maximum de toxicité

est alors atteint au bout de quatorze ou dix-huit heures d'étuve à 30°.

2° BOUILLONS TRÈS NUTRITIFS. — Dans les bouillons très nutritifs la formation de la toxine est très rapide : nous avons obtenu, en l'absence de phosphate et de pyruvate, des cultures ayant atteint leur maximum de toxicité, à 30°, quatorze heures après l'ensemencement.

Les résultats des titrages au cours de l'incubation montrent que la toxicité présente, après la phase d'accroissement progressif, une phase d'atténuation suivie d'une période de stabilisation.

#### TOXINOGENÈSE EN PRÉSENCE DE PHOSPHATE BIPOTASSIQUE ET DE PYRUVATE DE SOUDE.

EXPÉRIENCES A 35°. — Dans le bouillon Vf additionné, par litre, de 5 à 8 grammes de phosphate bipotassique et de 2 grammes de pyruvate de soude, on obtient après vingt-deux heures d'étuve, dans 9 cas sur 14, une fois et demie à deux fois plus de toxine que dans le bouillon Vf ordinaire. Le titre maximum des toxines obtenues au cours de ces expériences a été de 40 D. M. M. par centimètre cube.

EXPÉRIENCES A 30°. — 1° Au cours d'une expérience nous avons constaté que le titre de la toxine formée dans un bouillon Vf tamponné très nutritif est toujours supérieur à celui de la toxine existant au même moment dans le bouillon sans tampon (titrages après quatorze, dix-huit et vingt-deux heures d'étuve). Nous avons noté aussi que l'atténuation de la toxine est plus prononcée dans le bouillon Vf ordinaire que dans le bouillon tamponné.

2° En déterminant, après quatorze, dix-huit et vingt-deux heures d'étuve la toxicité des cultures effectuées dans des bouillons peu nutritifs, tamponnés ou non, nous avons noté les résultats suivants :

Après quatorze heures d'étuve, les cultures effectuées dans les bouillons Vf tamponnés sont plus toxiques que les cultures réalisées dans les mêmes bouillons sans tampons (4 expériences).

Après dix-huit heures d'étuve, dans trois expériences sur quatre, les cultures en bouillon tamponné sont plus toxiques que les autres.

Après vingt-deux heures, les toxines préparées dans les bouillons avec ou sans tampon ont le même titre (2 expériences).

#### TOXINOGENÈSE EN PRÉSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C).

L'acide ascorbique hâte le début du développement du *B. perfringens* dans le bouillon Vf et augmente légèrement. dans 3 cas sur 4, la production de la toxine *perfringens*.

#### TOXINOGENÈSE DANS LE BOUILLON Vf ADDITIONNÉ DE PEPTONES COMMERCIALES.

Dans les bouillons Vf peu favorables à la production de la toxine *perfringens* l'addition de 1 gramme par litre de peptone Vaillant PBC ou Defresne augmente la toxinogenèse (tableau XVIII).

#### PRÉPARATION DE LA TOXINE PERFRINGENS DANS LES MILIEUX SYNTHÉTIQUES.

Les différents milieux synthétiques qui ont été essayés jusqu'à présent n'ont pas encore permis d'obtenir des cultures abondantes et très toxiques de *B. perfringens* A.

En ajoutant des fragments de foie cuit à une solution contenant par litre 2 gr. 5 de phosphate bipotassique, 1 gramme de chlorure de sodium, 1 gramme de citrate de sodium, 0 gr. 5 de sulfate de magnésium, 2 gr. 5 d'asparagine et 0 gr. 5 de glucose, nous avons constitué un milieu dans lequel le développement est extrêmement intense mais la toxinogenèse moindre que dans les bouillons complexes à base de foie et de muscles. Les éléments qui assurent la multiplication rapide du *B. perfringens* ne suffisent donc pas à ce bacille pour élaborer à un taux normal les constituants divers de la toxine *perfringens*.



**ROLE DU CUIVRE EN QUANTITÉS INFINITÉSIMALES  
DANS L'ATTÉNUATION DES VENINS  
DE *VIPERA ASPIS* ET DE *NAJA TRIPUDIANS*  
ET D'UNE TOXINE VÉGÉTALE,  
LA RICINE, PAR LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE**

par PAUL BOQUET.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

Selon E. Lœwenstein [1], P. Nélis [2], J. M. Neill [3] et E. B. Carmichael [4] l'oxygène, sous la forme d'eau oxygénée, d'ozone ou d'oxygène libre, altère plus ou moins profondément les propriétés pathogènes et les qualités antigènes des toxines.

S. W. Mitchell et Reichert [5] avaient tenté, sans succès d'ailleurs, d'obtenir l'atténuation des venins de Crotale et de Cobra par addition d'eau oxygénée, et F. Micheel et F. Jung [6] constataient en 1936 que la neurotoxine du venin de *Naja flava* perd rapidement sa nocivité lorsqu'on l'oxyde en milieu alcalin. C'est en recherchant si le peroxyde d'hydrogène est capable de diminuer la toxicité du venin de vipère [*Vipera aspis*] (1) que nous avons été amené à étudier le rôle d'une substance adjuvante, le cuivre, qui intervient à doses infinitésimales dans le processus d'atténuation de ce poison [7].

\*  
\* \*

Dans deux séries de tubes de 17 millimètres de diamètre, on mélange en parties égales 3 cent. cubes de dilutions croissantes de Perhydrol Merck à 100 volumes (1/100, 1/250,

(1) C'est à la demande de M. le professeur A. Lacassagne, Directeur de l'Institut du Radium, que nous avons commencé à vérifier, en 1938, l'action de l'eau oxygénée sur le venin de vipère. Nous le prions d'agréer l'expression de notre reconnaissance.

1/500, 1/2.500), très légèrement alcalinisé à pH 7,5, 7,8 par NaoH, à 3 cent. cubes d'une solution de venin de *V. aspis* au 1/500 (2). Dans la première série, le solvant utilisé est l'eau distillée ordinaire ; dans la seconde, de l'eau redistillée dans un appareil en verre Pyrex. Chaque tube contient, sous le volume de 6 cent. cubes, un mélange de venin de *V. aspis* au 1/1.000 et d'eau oxygénée, dont la dilution va croissant de 1/200 à 1/5.000. Des solutions de venin en eau distillée ordinaire et en eau redistillée servent de témoins. Après un contact de vingt heures à 37°, la toxicité des mélanges et des solutions témoins est éprouvée par injection intraveineuse à des lapins de 2.000 à 2.500 grammes. Les résultats de cette expérience sont groupés dans le tableau I.

TABLEAU I.

DILUTION de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans les mélanges	Lapins éprouvés			
	avec 3 doses mortelles		avec 5 doses mortelles	
	de venin en eau redistillée	de venin en eau distillée ordinaire	de venin en eau redistillée	de venin en eau distillée ordinaire
1/200 . .	Mort en 2 min.	Survit.	Mort en 4 min. Mort en 3 min.	Survit. Survit.
1/500 . .	»	Survit.	Mort en 2 min.	Survit. Mort en 2 h.
1/1.000 .	Mort en 3 min.	Survit. Survit.	Mort en 5 min.	Survit. Survit. Mort en 10 h.
1/5.000 .	»	Mort en 4 min.	Mort en 2 min.	Mort en 2 min.

Les dilutions d'eau oxygénée seules se montrent inoffensives aux doses utilisées (3), et les lapins auxquels on injecte, par voie veineuse, trois ou cinq doses mortelles des solutions témoins de venin de *V. aspis*, conservées vingt heures à 37°, meurent en deux à cinq minutes.

(2) Le venin de *V. aspis* utilisé dans toutes ces expériences, tue régulièrement, par voie veineuse, à la dose de 0 milligr. 35 par kilogramme d'animal, les lapins pesant 2.000 à 2.500 grammes. Ce venin ne décompose pas l'eau oxygénée ; il ne renferme donc pas de catalase.

(3) Le Perhydrol à 100 vol. est supporté par les lapins, en injection intraveineuse, à la dose de 2 cent. cubes par kilogramme de poids vif d'une dilution au 1/50.

L'eau oxygénée atténue rapidement le venin en solution dans l'eau distillée ordinaire ; au contraire, lorsque les dilutions sont faites dans de l'eau redistillée dans un appareil en verre Pyrex, les mélanges de venin et d'eau oxygénée ne subissent aucune atténuation dans les mêmes délais. Il apparaît ainsi que l'eau distillée ordinaire contient une substance qui favorise l'action de l'eau oxygénée sur le venin. La première distillation étant effectuée dans un appareil en cuivre, nous avons pensé que la substance étrangère éliminée par une nouvelle distillation dans des vases en Pyrex pouvait être le métal même, entraîné avec l'eau dans l'opération préliminaire. Les expériences ci-après ont établi que cette hypothèse était fondée :

a) La recherche du cuivre selon la technique de Spacu et D. Bertrand a révélé la présence de traces de ce métal dans l'eau distillée ordinaire.

b) L'addition de quantités infinitésimales de cuivre (1 milligramme par litre) sous la forme de sulfate  $[\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}]$  (4), a conféré à l'eau redistillée des propriétés comparables à celles de l'eau distillée ordinaire (tableau II).

TABLEAU II.

DILUTION de $\text{H}_2\text{O}_2$ dans les mélanges	<i>Lapins éprouvés</i> avec 5 doses mortelles de venin traité par l'eau oxygénée	
	en eau bidistillée	en eau bidistillée + $\text{SO}_4\text{Cu}$
1/400 . . . . .	Mort en 2 min.	»
1/200 . . . . .	Mort en 3 min.	Survit.
1/500 . . . . .	»	Survit.
1/1.000 . . . . .	»	Mort en 10 h. environ.

L'animal témoin auquel on injecte la même quantité de venin en solution cuprique, mais sans eau oxygénée, meurt en deux minutes.

\*  
\* \*

Les caractères essentiels du phénomène étant déterminés, les expériences suivantes devaient avoir pour but de préciser

(4) Deux échantillons de sulfate de cuivre ont été utilisés : un sulfate pur pour analyse de Merck et un sulfate de la Baker Chemical Co.

le mécanisme de l'atténuation du venin dans les circonstances précitées et d'étendre les constatations faites à propos du venin de *Vipera aspis*, au venin de *Naja tripudians*, et à une toxine végétale : la Ricine (5).

### I. — Atténuation du venin de *Vipera aspis*.

Des mélanges de venin de vipère (au 1/1.000) et de quantités décroissantes d'eau oxygénée, en présence d'une dose constante de cuivre (1 milligramme par litre, sous la forme de sulfate) sont laissés quatre heures, six heures et vingt heures à 37°, puis injectés au lapin par voie veineuse.

TABLEAU III.

DILUTION de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans les mélanges	Lapins ayant reçu par voie veineuse (6) des mélanges de venin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SO <sub>4</sub> Cu laissés à 37°		
	pendant 4 h.	pendant 6 h.	pendant 20 h.
1/100 . . .	Survit.	Survit.	Survit.
1/200 . . .	Survit.	Survit.	Survit.
		Survit.	Survit.
			Survit.
1/400 . . .	Mort en 3 min.	Survit.	Survit.
		Survit.	
		Mort en 10 h.	
1/800 . . .	»	Mort en 30 min.	Survit.
1/1.000 . .	»	»	Mort en 10 h.
			Mort en 5 min.

L'atténuation du venin est donc d'autant plus marquée que le temps de contact entre les réactifs est plus long et la quantité d'oxygène actif plus élevée. En l'absence de métal, l'atténuation du venin par l'eau oxygénée s'effectue lentement et de fortes concentrations de Perhydrol sont nécessaires (tableau IV).

Le rôle activateur du cuivre peut encore être mis en évidence de la façon suivante :

Un mélange de venin et d'eau oxygénée seule (au 1/100 et

(5) Cette expérimentation nécessita l'emploi de récipients en verre « Sibor » très soigneusement lavés et rincés à l'eau bidistillée.

(6) Le volume injecté correspond à 5 doses minima mortelles de venin pur.



TABLEAU IV.

DILUTIONS de $H_2O_2$ dans les mélanges	Lapins éprouvés (7) avec des mélanges laissés à 37°			
	pendant 4 h.	pendant 6 h.	pendant 20 h.	pendant 40 h.
1/100 . .	Mort en 1 min. Mort en 2 min.	Mort en 2 min. Mort en 2 min.	Mort en 4 min. Mort en 2 min. Mort en 2 min. Mort en 5 min.	Survit. Survit.
1/200 . .	»	»	Mort en 2 min. Mort en 2 min. Mort en 3 min.	Mort en 2 h.
1/400 . .	»	»	»	Mort en 2 min.

au 1/200) qui, après seize heures d'étuve, a conservé sa nocivité, cesse de se montrer toxique après quatre heures à 37° si on l'additionne d'une trace de sulfate de cuivre (1 milligramme par litre). Le mélange témoin reste toxique après le même délai.

Dans toutes ces expériences, 9 lapins témoins ayant reçu du venin aux mêmes doses, en solution dans de l'eau bidistillée ou dans de l'eau bidistillée additionnée de sulfate de cuivre, mais sans eau oxygénée, sont morts en quelques minutes.

#### a) INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE CUIVRE.

Lorsque les mélanges de venin, d'eau oxygénée et de sulfate de cuivre renferment des quantités de métal inférieures à 1 milligramme par litre, la réaction est d'autant plus lente à 37° que la dose de cuivre est plus faible (tableau V). Mais pour des quantités de cuivre de 2 milligr. 5 et 5 milligrammes par litre, l'atténuation du venin est sensiblement égale à celle des mélanges renfermant 1 milligramme de métal par litre.

#### b) INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.

Deux séries de mélanges contenant du venin de *V. aspis*, de l'eau oxygénée et du sulfate de cuivre, préparés comme

(7) Le volume injecté correspond à 5 doses minima mortelles de venin pur.

TABLEAU V.

		QUANTITÉ DE CUIVRE (EN MILLIGRAMME) PAR LITRE			
DILUTION		0,1	0,5		
de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Lapins éprouvés (8)			
dans		avec les mélanges laissés à 37°			
les mélanges		pendant 20 h.	pendant 4 h.	pendant 6 h.	pendant 20 h.
	—	—	—	—	—
1/100 . . . . .	Mort en 30 min.	Mort en 10 h.	Survit.		
1/200 . . . . .	Mort en 10 h.	Mort en 2 min.	»	Survit.	
1/400 . . . . .	»	»	»	Survit.	
1/800 . . . . .	»	»	»	Mort en 3 min.	

DILUTION de $H_2O_2$ dans	QUANTITÉ DE CUIVRE (EN MILLIGRAMME) PAR LITRE		
	1		
	<i>Lapins éprouvés</i> (8) avec les mélanges laissés à 37°		
les mélanges	pendant 4 h.	pendant 6 h.	pendant 20 h.
—	—	—	—
1/100 . . . . .	Survit.	Survit.	Survit.
1/200 . . . . .	Survit.	Survit.	Survit.
1/400 . . . . .	Mort en 3 min.	Mort en 10 h.	Survit.
		Survit.	
1/800 . . . . .	»	Mort en 30 min.	Survit.
1/1.000 . . . . .	»	»	Mort en 10 h. Mort en 5 min.

dans les expériences précédentes, ont été laissées, l'une à + 4°, l'autre à + 37°. Après six heures et vingt heures à + 4°, les solutions venimeuses contenant 1/100 et 1/200 d'eau oxygénée n'ont subi aucune atténuation ; les solutions qui avaient séjourné à + 37° ont perdu leur toxicité.

### c) INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU.

Deux nouvelles séries de mélanges, préparés comme il vient d'être dit, reçoivent l'une de l'eau oxygénée telle quelle (à pH 5,3 environ), l'autre de l'eau oxygénée alcalinisée à pH 8 au moyen de NaOH à 30 p. 100. L'atténuation des mélanges alcalins, après une heure trente et vingt heures de contact à 37°, est plus marquée que celle des mélanges non alcalinisés (tableau VI). Les animaux témoins éprouvés avec

(8) Le volume injecté correspond à 5 doses minima mortelles de venin pur.

les mêmes doses de venin placés vingt heures à 37° dans des solutions cupriques dont le pH variait de 5,8 à 9 moururent en quelques minutes.

TABLEAU VI.

<i>Lapins éprouvés</i> avec des mélanges demeurés 1 heure 30 à 37° (doses d'épreuves correspondant à 3 doses minima mortelles de venin)				
DILUTION de $H_2O_2$ dans les mélanges	Mélanges additionnés d' $H_2O_2$ à pH 5,5		Mélanges additionnés d' $H_2O_2$ à pH 8	
	en eau bidistillée	en eau bidistillée + $SO_4Cu$	en eau bidistillée	en eau bidistillée + $SO_4Cu$
—	—	—	—	—
1/400 . . . .	Mort en 4 min.	Survit.	Mort en 2 min.	Survit.
1/200 . . . .	»	Mort en 5 min.	»	Survit.

<i>Lapins éprouvés</i> avec les mêmes mélanges demeurés 20 heures à 37° (dose d'épreuve correspondant à 5 doses minima mortelles de venin)				
DILUTION de $H_2O_2$ dans les mélanges	Mélanges additionnés d' $H_2O_2$ à pH 5,5		Mélanges additionnés d' $H_2O_2$ à pH 8	
	en eau bidistillée	en eau bidistillée + $SO_4Cu$	en eau bidistillée	en eau bidistillée + $SO_4Cu$
—	—	—	—	—
1/400 . . . .	Mort en 2 min.	»	Mort en 2 min.	
1/200 . . . .	Mort en 3 min.	Survit.		
1/400 . . . .	»	Survit.		
1/800 . . . .	»	Mort en 20 h.		Survit.

#### d) INFLUENCE DE LA NATURE DU MÉTAL.

Les métaux suivants furent substitués au cuivre : le chrome (9), le fer, le nickel, le manganèse, sous la forme de sulfate (sulfate pur de Merck), la concentration de chaque métal par litre de solution étant de 1 milligramme. La toxicité du venin de vipère traité pendant six heures à 37° par l'eau oxygénée en présence des précédents métaux fut déterminée par injection intraveineuse à des lapins de 2.000 à 2.500 grammes; la quantité injectée correspondait à cinq doses mortelles de venin pur. Les résultats sont résumés dans le tableau VII.

Un lapin éprouvé avec la même dose d'un mélange de venin et de sulfate de chrome, sans eau oxygénée, est mort en deux minutes.

(9) La teneur du sulfate de chrome utilisé en  $Cr_2O_3$  était de 33 p. 100.

TABLEAU VII.

DILUTION de $H_2O_2$ dans les mélanges	Animaux éprouvés avec des mélanges contenant les métaux suivants				
	Mélange témoin (eau bidistillée seule)	Fer	Nickel	Chrome	Manganèse
1/100 . .	Mort en 2 min.	Mort en 2 min.	Mort en 3 min.	Survit.	Mort en 2 min.
1/200 . .	»	»	»	Survit. Mort en 10 h.	

Si le fer, le nickel, le manganèse sont, dans les conditions de notre expérience, sans action sur la vitesse de l'atténuation du venin par l'eau oxygénée, le chrome, comme le montrent les résultats du tableau VII, jouit d'une activité analogue à celle du cuivre mais moins prononcée.

\*  
\* \*

Le venin de vipère rendu inoffensif pour le lapin (épreuve intraveineuse) est-il totalement privé de sa toxicité ? En d'autres termes, tous les facteurs de cette toxicité sont-ils également affaiblis par l'oxydation ?

Pour répondre à cette question, du venin de vipère atténué par l'addition de Perhydrol et de cuivre fut injecté à des

TABLEAU VIII.

DILUTION de $H_2O_2$ dans les mélanges	DOSE de cuivre (en milligramme par litre)	TEMPS de contact à 37° entre les réactifs (en heures)	LES COBAYES éprouvés présentent
1/200 . . . . .	4	6	T. V. T. V.
1/200 . . . . .	4	20	T. V.
1/200 . . . . .	5	20	T. V. 0
1/100 . . . . .	0	20	E. H.
a) Venin sans $H_2O_2$ . . . . .	4	6	E. H. E. H.
b) Venin sans $H_2O_2$ . . . . .	5	20	E. H. E. H.
c) $H_2O_2$ 1/200 sans venin. . . . .	4	6	0 0
d) $H_2O_2$ 1/200 sans venin. . . . .	5	20	0 0

0, aucune réaction; T. V., tache violette; E. H., escarre humide, hémorragique.



cobayes (de 350 grammes environ) sous la peau, en vue de déceler éventuellement les substances hémorragipares et nécrosantes résiduelles.

Il n'est pas douteux que l'action combinée de l'eau oxygénée et du cuivre atténue le pouvoir nécrosant du venin de vipère, mais cette atténuation est moins marquée que celle de la substance coagulante (dont les effets ont été mesurés *in vivo* par injection *intraveineuse au lapin*), et elle nécessite une concentration plus élevée en eau oxygénée et en métal. Avec E. Césari [8], et dans d'autres circonstances, nous avons déjà signalé cette inégale sensibilité des constituants du venin de vipère.

## II. — Atténuation du venin de *Naja tripudians*.

Au venin de vipère très labile, nous avons substitué dans les expériences suivantes le venin de Cobra (*Naja tripudians*) dont la neurotoxine stable est plus résistante à l'action des agents physiques et chimiques.

La technique suivie a été la même que pour le venin de vipère : mélange en parties égales (3 cent. cubes) de solution de venin de Cobra à 2 milligrammes par centimètre cube avec des solutions d'eau oxygénée, additionnées de quantités décroissantes de sulfate de cuivre et laissées à 37° pendant des temps variés. La toxicité des mélanges fut éprouvée par l'injection intraveineuse au lapin, de 2.000 à 2.500 grammes, d'une quantité correspondant à cinq doses minima mortelles de venin de Cobra, soit 1 milligramme par kilogramme d'animal.

Pour une dose de métal correspondant à 5 milligrammes par litre, le venin est atténué après vingt-quatre heures d'étuve dans les mélanges contenant 1/400 d'eau oxygénée ; après trois jours, l'atténuation se manifeste encore lorsque la dilution de l'eau oxygénée est de 1/1.000 ; après quatre jours d'étuve, la dose minima active de Perhydrol s'abaisse à 1/1.600.

Lorsque la teneur des mélanges en cuivre est réduite à 2 milligr. 5 par litre, une concentration d'eau oxygénée au 1/100 est nécessaire pour atténuer le venin en vingt-quatre

heures. Il faut quarante-huit heures pour produire le même effet lorsque la dilution de l'eau oxygénée est de  $1/200$ , trois jours lorsqu'elle est de  $1/800$  et huit jours lorsque cette dilution atteint  $1/1.200$ . Si la quantité de métal est réduite à 1 milligramme par litre, il faut attendre quatre jours pour constater la disparition de la toxicité du venin dans les solutions qui contiennent  $1/400$  de Perhydrol et huit jours pour celles qui n'en renferment que  $1/800$ . En l'absence de cuivre, les solutions témoins de venin contenant  $1/100$  et  $1/200$  d'eau oxygénée, restent toxiques après quatre jours d'étuve. Plus tard, à partir du sixième jour, on constate une atténuation de la toxicité des mélanges contenant  $1/100$  de Perhydrol : mais les mélanges qui en renferment  $1/200$  demeurent nocifs : après huit et neuf jours, ils tuent encore les lapins auxquels on les injecte par voie veineuse. Dans les mêmes délais, les solutions témoins de venin tel quel ou de venin additionné de  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , conservent toute leur activité.

Cette atténuation du venin de Cobra par le peroxyde d'hydrogène, en présence de faibles quantités de cuivre, est plus lente que celle du venin de vipère qui, dans les mêmes conditions est privé en quelques heures de sa toxicité. Elle est également en relation avec les quantités d'oxygène actif contenues dans les mélanges, ainsi qu'avec la durée du contact entre les réactifs. Elle s'effectue d'autant plus vite que, à dose égale d'eau oxygénée, les quantités de cuivre ajoutées aux mélanges sont plus fortes, au moins jusqu'à 0 milligr. 005 de métal par centimètre cube, dose que nous n'avons pas dépassée dans ces expériences.

### III. — Atténuation de la Ricine.

Par comparaison avec les faits que nous avons mis en évidence en étudiant les venins de *V. aspis* et de *N. tripudians*, nous avons recherché si l'addition de traces de cuivre à un mélange d'une toxine végétale et de proportions convenables d'eau oxygénée est également capable de produire à bref délai une atténuation de ce poison.

L'échantillon de ricine (10) que nous avons employé tue le lapin de 2.000 à 2.500 grammes en moins de vingt-quatre heures, lorsqu'il est injecté par voie veineuse à la dose de 0 milligr. 1 par kilogramme de poids vif. On mélange en parties égales (3 cent. cubes) une solution contenant 2 milligrammes de cette ricine par centimètre cube à des dilutions croissantes de Perhydrol et on additionne une partie de ces mélanges de 0 gr. 001 p. 1.000 (1 milligramme par litre) de sulfate de cuivre.

D'autre part, on prépare une solution témoin renfermant les mêmes proportions de ricine et de  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , mais sans peroxyde d'hydrogène. Ces trois séries de solutions : Ricine +  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; Ricine +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Cuivre ; Ricine + Cuivre sont portées à 37°. La toxine ainsi traitée est laissée six et vingt heures à l'étuve, puis injectée par voie veineuse à des lapins de 2.000 à 2.500 grammes à la dose de 0 milligr. 5 par kilogramme d'animal (5 doses minima mortelles).

Les résultats obtenus avec la ricine laissée pendant six heures à 37° sont groupés dans le tableau IX.

TABLEAU IX.

DILUTION de $\text{H}_2\text{O}_2$ dans les mélanges	LE LAPIN INJECTÉ AVEC LE MÉLANGE	
	Ricine + $\text{H}_2\text{O}_2$ + Cu	Ricine + $\text{H}_2\text{O}_2$
1/100 . . . . .	Survit.	Meurt en moins de 20 h. Meurt en moins de 20 h.
1/200 . . . . .	Survit.	
1/400 . . . . .	Survit.	
1/800 . . . . .	Survit.	
1/1.000 . . . . .	Survit.	
1/1.200 . . . . .	Survit.	
1/2 000 . . . . .	Meurt en 30 h.	

Deux lapins auxquels on avait injecté par voie veineuse la solution témoin de ricine + cuivre aux mêmes doses sont morts en moins de vingt-quatre heures.

Six heures de séjour à 37° suffisent à priver la ricine de sa toxicité dans les mélanges renfermant 1/1.200 d'eau oxygénée; après vingt heures, et dans les mêmes conditions, cette atténuation devient manifeste dans les mélanges ne contenant

(10) Ricine Merck préparée selon le procédé de Kobert.

que 1/2.000 de Perhydrol, alors que les mélanges témoins renfermant vingt fois plus de Perhydrol, mais exempts de métal, et les mélanges ricine + cuivre, sans eau oxygénée, restent toxiques.

De faibles quantités d'eau oxygénée (1/1.000) en présence de sulfate de cuivre (1 milligramme de Cu par litre) provoquent d'ailleurs l'atténuation d'assez fortes quantités de toxine, ainsi qu'en témoignent les résultats obtenus en éprouvant un mélange resté six heures à 37° (tableau X).

TABLEAU X.

NOMBRE de doses mortelles injectées au lapin par voie veineuse	POIDS de ricine en milligrammes	RÉSULTAT
—	—	—
10 . . . . .	1	Survit.
20 . . . . .	2	Survit.
30 . . . . .	3	Survit.
75 . . . . .	7,5	Mort en moins de 24 h.

Deux lapins témoins éprouvés avec cinq doses mortelles de ricine, traités par l'eau oxygénée en l'absence de métal, sont morts en moins de vingt-quatre heures.

#### IV. — Propriétés immunisantes des venins et de la ricine privés de leur toxicité.

L'action brutale de l'eau oxygénée altère les antigènes (J. M. Neill, W. L. Fleming et E. L. Gaspari [9]), cependant les venins de *Vipera aspis*, de *Naja tripudians* et la ricine, privés de leur activité pathogène par oxydation ménagée en présence de cuivre, exercent encore leurs propriétés antigènes, ainsi qu'en témoignent les expériences suivantes :

##### A. — EXPÉRIENCES AVEC LE VENIN DE V. ASPIS.

Quatre lapins sont préparés comme il suit par des injections hebdomadaires de venin de vipère atténué (11).

(11) Cu = 1 milligramme par litre; dilution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allant de 1/100 à 1/500 ; étuve, vingt heures à 37°.



*Le lapin n° 1* reçoit 3 injections intraveineuses d'antigène correspondant à 3 milligr. 76, 2 milligrammes et 4 milligrammes de venin pur. Neuf jours après la dernière immunisation, l'animal survit à l'injection intraveineuse d'une dose mortelle et demie de venin pur (0 milligr. 5 par kilogramme de poids vif).

*Le lapin n° 2* reçoit 5 injections d'antigène de 2 milligr. 10, 2 milligr. 20, 3 milligr. 5, 3 milligr. 5, 10 milligrammes chacune. Celui-ci résiste quatorze jours après la dernière injection à l'épreuve intraveineuse de deux doses mortelles de venin (0 milligr. 70 par kilogramme).

*Le lapin n° 3* reçoit 5 injections d'antigène de 2 milligr. 25, 2 milligr. 30, 3 milligr. 76, 3 milligr. 86, 10 milligrammes chacune. Comme l'animal précédent, après les mêmes délais et dans les mêmes conditions, ce lapin supporte deux doses mortelles de venin pur (0 milligr. 70 par kilogramme).

*Le lapin n° 4* reçoit 6 injections d'antigène de 4 milligrammes, 4 milligrammes, 5 milligrammes, 5 milligrammes, 7 milligrammes, 8 milligrammes chacune. Six jours après la dernière injection, l'animal survit à l'injection intraveineuse de trois doses mortelles de venin pur (1 milligr. 05 par kilogramme).

Deux lapins neufs sont morts deux minutes après l'injection par cette même voie d'une seule dose mortelle de venin, soit 0 milligr. 35 par kilogramme de poids vif.

#### B. — EXPÉRIENCES AVEC LE VENIN DE COBRA.

Il est possible de conférer une immunité appréciable au lapin à l'égard du venin de Cobra par des injections répétées de venin atténué.

Un lapin, traité par 7 injections (dont 3 par voie veineuse et 4 par voie sous-cutanée) de 2 milligrammes d'antigène pour les six premières et de 4 milligrammes pour la dernière (12), a résisté sept jours après la dernière immunisation à l'injection intraveineuse de deux doses mortelles de venin pur (0 milligr. 4 par kilogramme d'animal). Un second lapin, soumis au même traitement, a succombé dix heures après l'épreuve d'une même quantité de venin, alors qu'un lapin neuf est mort moins de trente minutes après l'injection d'une dose mortelle de venin pur.

#### C. — EXPÉRIENCES AVEC LA RICINE.

Les propriétés antigéniques et vaccinales de la ricine traitée par l'eau oxygénée et le cuivre furent mises en évidence de la façon suivante :

(12) Cu = 1 et 5 milligrammes par litre ; dilution de  $H_2O_2$  au 1/200 et au 1/400 ; mélanges placés vingt-quatre heures à 37°.

Trois lapins de 2.000 grammes environ, immunisés par 3 injections intraveineuses de 1, 2, 3 milligrammes de ricine détoxiquée par oxydation (13) à raison d'une injection par semaine, résistèrent dix jours après la dernière injection à l'épreuve intraveineuse de deux, trois et quatre doses mortelles de ricine pure.

Trois autres lapins qui avaient reçu selon le même rythme 6 injections de 1, 2, 3, 4, 5, 6 milligrammes d'antigène (13), fournirent un sérum qui neutralisait *in vitro*, à la dose de 5 cent. cubes, 1 milligramme de ricine pure, après un contact de trente minutes à 37°, l'épreuve étant faite par injection intraveineuse d'un mélange contenant une quantité fixe de toxine (5 doses mortelles) et des doses variables d'immunsérum.

Le même sérum jouit de propriétés précipitantes à l'égard de l'antigène homologue. Des mélanges *in vitro* de 1 milligramme de ricine, sous le volume de 1 cent. cube, et de quantités croissantes d'immunsérum (0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c. c. 3... à 3 cent. cubes) précipitent abondamment après dix et trente minutes de séjour à 37°, alors que des mélanges témoins du même antigène et de sérum normal de lapin demeurent limpides dans le même temps.

\*  
\* \*

De l'ensemble de ces expériences, il ressort que l'eau oxygénée détruit rapidement à 37° la toxicité des venins (*V. aspis*, *N. tripudians*) et de la ricine, lorsque l'oxygène actif est fixé sur ces produits par l'intermédiaire d'un métal, en l'espèce le cuivre (14). La vitesse de cette action est en relation avec la quantité d'eau oxygénée contenue dans les mélanges, avec la température ambiante, la durée de contact entre les réactifs, leur réaction alcaline, et, jusqu'à une dose optima de métal, pour le venin de *V. aspis*, avec la teneur des solutions en cuivre.

(13) Cu = 1 milligramme par litre ; dilution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allant de 1/400 à 1/2 000 ; mélanges placés vingt heures à 37°.

(14) Les termes d'oxyvenin, d'oxyricine et plus généralement celui d'oxytoxine pourraient être appliqués aux substances ainsi obtenues.

Le fer, le nickel et le manganèse n'ont manifesté en présence de Perhydrol aucun effet atténuant à l'égard du venin de vipère. Par contre, le chrome a exercé, bien qu'à un moindre degré, une activité analogue à celle du cuivre.

Le cuivre jouit des propriétés essentielles des peroxydases ; cependant cette constatation n'exclut pas la possibilité d'une action plus étroitement spécifique de l'ion métal sur le venin, en présence d'eau oxygénée, et la formation d'un complexe cuprique. Le cuivre, important catalyseur d'oxydations, trouve en effet sa place parmi ces infiniment petits chimiques (G. Bertrand [10]) dont les effets multiples nous échappent encore partiellement.

L'histoire de la catalyse des phénomènes d'oxydation par ce métal remonte aux expériences de Bourquelot et Bourgaud [11], qui, en 1897, observèrent l'oxydation de la résine de Gaïac par l'oxygène de l'air en présence de cuivre. Un peu plus tard, M. J. Wolff [12] (1908) parvint à oxyder des colorants au moyen de l'eau oxygénée additionnée de sulfate de fer ou de sulfate de cuivre ; il en conclut que ces métaux se comportaient comme de véritables peroxydases.

Plus récemment, A. F. Hesse et L. J. Unger [13], E. S. Barron, R. H. de Meio et F. Khemperer [14], F. G. Hopkins et E. J. Morgan [15] ont insisté sur le rôle du cuivre dans le processus d'oxydation de l'acide ascorbique. De petites quantités de fer ou de cuivre seraient également nécessaires à l'oxydation de la cystéine et du glutathion de Hopkins (A. Mathews et S. Walker [16], O. Warburg et S. Sakuma [17], D. Harrison [18], C. Evehjem [19], N. Meldrum et M. Dixon [20], F. G. Hopkins et E. J. Morgan [15], J. S. Fruton et H. T. Clarke [21]). Plus encore, des diastases seraient particulièrement sensibles à l'oxygène en présence de cuivre. Enfin, inactivée par oxydation, la papaïne et l'uréase cristallisée (15) récupèrent leurs fonctions diastasiques sous l'influence de réducteurs appropriés : hydrogène sulfuré, thioglycolate ou cystéine (J. Sumner et L. Pollard [22], L. Hellerman et W. E. Perkins [23], L. Hellerman, W. E. Perkins et W. M. Clark [24]).

(15) Ni le cobalt, ni le fer, ni le manganèse n'affecteraient l'activité de l'uréase cristallisée (L. Hellerman) [25].

Selon J. M. Neill, W. L. Fleming et E. L. Gaspari [9], les hémolysines pneumococcique et streptococcique, ainsi que la tétanolysine, privées de leurs propriétés lytiques par oxydation, sont réactivables par addition de substances réductrices. H. Shwachman, L. Hellerman et B. Cohen [26] ont insisté sur le fait que l'hémolysine pneumococcique, active sous sa forme réduite, est inhibée d'une manière réversible par les substances qui altèrent le groupe thiol (-SH). Le lysozyme du blanc d'œuf ne serait doué de propriétés physiologiques que sous la forme réduite (-SH) de son composé sulphydrilé (K. Meyer, R. Thomson, J. W. Palmer et D. Khorazo [27]). Dans le même ordre de faits, F. G. Hopkins et E. J. Morgan [28] et L. Rapkine [29] rapportent que certaines deshydrases sont privées de leurs fonctions diastasiques au contact de substances dont l'activité semble liée à leurs propriétés d'altérer les groupements protéiniques thiolés (-SH) [glutathion oxydé, cuivre] [16].

Il apparaît ainsi que l'inhibition de certains ferments est en relation avec leur état d'oxydation ou de réduction et, par suite, avec l'intégrité de leurs groupements -SH.

Si les venins offrent des similitudes quant à leurs propriétés physiologiques avec les enzymes (par leurs fonctions diastasiques coagulante, protéolytique, phosphatidasique, etc...), ils présentent aussi avec ces substances des analogies de constitution. F. Micheel et F. Jung ont observé que la neurotoxine du venin de Cobra, dont la teneur en soufre est élevée, stable en milieu dont le pH varie entre 2 et 8, peut être inactivée par l'oxygène en milieu alcalin et réactivée en milieu acide, par l'addition de cystéine [-SH] : le cuivre favoriserait la réaction. Par contre, L. Binet, G. Weller et Jaulmes [32, 33] sont parvenus à priver de sa toxicité le venin de Cobra par addition de glutathion sous sa forme réduite, et C. Slotta, en collaboration avec H. L. Fraenkel-Conrat [34], a obtenu l'atténuation des venins de *Crotalus terrificus* et de *Bothrops jararaca* en les additionnant de cystéine (-SH).

16° Il convient de rapprocher de ces faits les remarquables observations de ZINSSER et SEASTONE [30] qui rapportent que certains virus inactivés par oxydation sont capables de récupérer leur activité pathogène sous l'influence d'agents réducteurs (cystéine). Ce fait a été confirmé par PERDRAU [31].



Nos expériences tendent à établir que le processus d'atténuation des venins et de la ricine par l'eau oxygénée et le cuivre est, dans une certaine mesure, comparable au processus d'inactivation des diastases par les mêmes substances (17). Sans doute, le mécanisme intime de l'action catalytique du cuivre demeure-t-il obscur, et l'équation obtenue en comparant la somme des facteurs qui interviennent dans le phénomène aux produits terminaux ne représente-t-elle que le début et la fin d'une longue suite de réactions dont les phases intermédiaires sont inconnues; néanmoins, les faits que nous avons mis en évidence montrent que les substances capables de modifier l'équilibre des systèmes oxydo-réducteurs des venins et des toxines végétales altèrent profondément leurs propriétés physiologiques.

### Conclusion.

En résumé, si l'eau oxygénée atténue rapidement la toxicité des venins (*Vipera aspis* et *Naja tripudians*) et de la ricine, lorsque l'oxygène actif est fixé sur ces produits par l'intermédiaire du cuivre, elle n'altère pas sensiblement leurs qualités antigéniques et leurs propriétés vaccinales. Le fer, le nickel, le manganèse substitués au cuivre sont sans effet sur la réaction; par contre, le chrome exerce une activité comparable à celle du cuivre. Le métal agit vraisemblablement comme un catalyseur peroxydasique ou détermine des modifications du venin telles qu'il en faciliterait l'oxydation par l'eau oxygénée.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LOEWENSTEIN (E.). *Wiener Klin. Woch.*, 1903, p. 1393.
- [2] NÉLIS (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, 94, 1926, p. 139.
- [3] NEILL (J. M.). *J. Exp. Med.*, 44, 1926, p. 199, 215, 225, 241.
- [4] CARMICHAEL (E. B.). *J. Pharm. Exp. Therap.*, 35, 1929, p. 193.
- [5] MITCHELL (S. W.) et REICHERT. In PHISALIX, Les animaux venimeux et les venins, p. 482, Masson et C<sup>ie</sup>, Paris, 1922.
- [6] MICHEEL (F.) et JUNG (F.). *Hoppe-Seyler's Zeitsch. f. Physiol. Chem.*, 239, 1936, p. 217.

(17) Des essais de réactivation des venins et de la ricine ainsi atténués, interrompus par suite des circonstances, seront repris dans un avenir prochain.

- [7] BOQUET (P.). *C. R. Ac. Sc.*, **208**, 1939, p. 770 ; *C. R. Soc. de Biol*, **131**, 1940, p. 7, 1207 et **132**, p. 413.
- [8] CÉSARI (E.) et BOQUET (P.). *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 307 ; **63**, 1939, p. 592 ; *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, p. 19.
- [9] NEILL (J. M.), FLEMING (W. L.) et GASPARI (E. L.). *J. Exp. Med.*, **46**, 1927, p. 735.
- [10] BERTRAND (G.). *C. R. Ac. Sc.*, **137**, 1903, p. 1269 ; *Ann. Ferment.*, **4**, 1938, p. 65.
- [11] BOURQUELOT et BOURGAUT. *C. R. Soc. de Biol.*, **4**, 1897, p. 498.
- [12] WOLFF (M. J.). *C. R. Ac. Sc.*, **146**, 1908, p. 142 et *Thèse* : Contribution à la connaissance de divers phénomènes oxydasiques naturels et artificiels, Paris, 1910.
- [13] HESSE (A. F.) et UNGER (L. J.). *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, **19**, 1921, p. 119.
- [14] BARRON (E. S.), DE MEIO (R. H.) et KHEMPERER (F.). *J. Biol. Chem.*, **112**, 1936, p. 625.
- [15] HOPKINS (F. G.) et MORGAN (E. J.). *Biochem. J.*, **32**, 1938, p. 1446.
- [16] MATHEWS (A.) et WALKER (S.). *J. Biol. Chem.*, **6**, 1909, p. 21, 29, 289, 299.
- [17] WARBURG (O.) et SAKUMA (S.). *Pflüg. Arch.*, **200**, 1923, p. 203.
- [18] HARRISON (D.). *Biochem. J.*, **21**, 1927, p. 335.
- [19] ELVEHJEM (C.). *Biochem. J.*, **24**, 1930, p. 415.
- [20] MELDRUM (N.) et DIXON (M.). *Biochem. J.*, **24**, 1930, p. 472.
- [21] FRUTON (J. S.) et CLARKE (H. T.). *J. Biol. Chem.*, **106**, 1934, p. 667.
- [22] SUMNER (J.) et POLLAND (L.). *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, **30**, 1933, p. 553.
- [23] HELLERMAN (L.) et PERKINS (W. E.). *J. Biol. Chem.*, **107**, 1934, p. 241.
- [24] HELLERMAN (L.), PERKINS (W. E.) et CLARK (W. N.). *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **19**, 1933, p. 855.
- [25] HELLERMAN (L.). *Physiol. Rev.*, **17**, 1937, p. 454.
- [26] SHWACHMAN (H.), HELLERMAN (L.) et COHEN (B.). *J. Biol. Chem.*, **107**, 1934, p. 257.
- [27] MEYER (K.), THOMSON (R.), PALMER (J. W.) et KHORAZO (D.). *J. Biol. Chem.*, **113**, 1936, p. 303.
- [28] HOPKINS (F. G.) et MORGAN (E. J.). *Biochem. J.*, **32**, 1938, p. 611.
- [29] RAPKINE (L.). *Biochem. J.*, **32**, 1938, p. 1729.
- [30] ZINSSER (H.) et SEASTONE (C. V.). *J. Immunol.*, **18**, 1930, p. 1.
- [31] PERDRAU (J. R.). Cité in *Handbuch der virusforschung*. — DOERR (R.) et HALLANER (C.). 1938, article de STANLEY (W. M.).
- [32] BINET (L.), WELLER (G.) et JAULMES. *C. R. Ac. Sc.*, **204**, 1937, p. 1513.
- [33] BINET (L.) et WELLER (G.). *Le Glutathion. Coll. Actualités Scientifiques et Industrielles*, Hermann et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1937.
- [34] SLOTTA (C.) et FRAENKEL CONRAT (H. L.). *Mem. Inst. Butantan.*, **11**, 1937, p. 121.

## NOTE SUR L'HISTOPLASMOSE DE DARLING

par J. BABLET.

(Laboratoires des Instituts Pasteur d'Outre-Mer.)

Je dois à l'obligeance de mon ami le Dr Villela, pathologiste des laboratoires de la Fondation Rockefeller, à Rio de Janeiro, d'avoir pu examiner, au cours d'un voyage d'études au Brésil, des préparations de foie (1) montrant les lésions caractéristiques de l'histoplasmosse de Darling. Il s'agit d'une affection rare, peut-être exceptionnelle, dont 11 cas seulement ont été publiés jusqu'à ce jour, et presque tous observés en Amérique.

Il n'est pas surprenant que cette maladie ne soit pas encore très connue en Europe, mais je pense qu'il y a tout intérêt à la faire connaître et à attirer en particulier l'attention des laboratoires coloniaux sur ses caractères cliniques, bactériologiques et histologiques. Un cas signalé aux Indes néerlandaises permet en effet de penser que cette curieuse affection n'est pas limitée au Nouveau-Monde et que la perspicacité des chercheurs en découvrira de nouveaux cas dans d'autres continents.

APERÇU HISTORIQUE. — Les trois premières observations sont dues à Darling : Echelonnées entre 1906 et 1909 à Panama, elles concernaient deux noirs originaires de la Martinique et un Chinois habitant l'Amérique Centrale depuis quinze ans. Le parasite, visible dans les lésions hépatiques et spléniques fut d'abord considéré par Darling comme un protozoaire voisin des *Leishmania* et reçut le nom d'*Histoplasma capsulatum*. Dès 1912 cependant un savant brésilien, Rocha Lima, suggérait son identification au *Cryptococcus farciminosus* de Rivolta, étudié par Marcone, Tokishiga (1896), San Felice

(1) Ce cas décelé grâce à la viscérotomie systématique était en instance de publication quand nous avons quitté le Brésil, en septembre 1939.

(1906), et cultivé en série par A. Boquet et L. Nègre (1917-1918).

En 1925, Darling et Rocha Lima étaient d'accord pour voir dans l' *Histoplasma capsulatum*, non plus un protozoaire, mais un champignon.

Toutefois la première culture ne fut obtenue qu'en 1934 (Dodd). Entre temps, 3 autres cas avaient été signalés en Amérique du Nord par Riley et Watson (1926) ; par Phelps et Mallory, la même année, et par Crumrine et J. F. Kessel (1931). Dans ces six premières observations le diagnostic avait été fait par l'examen des pièces nécropsiques. Le septième cas, observé par Dodds et Tomkins dans le Tennessee permit l'identification du parasite dans le sang du malade et la culture après la mort par ensemencement de la pulpe splénique.

H. Muller rapporta en 1931 un cas d'histoplasmose de Darling constaté à Java (Indes néerlandaises). Hansmann et Schenker (1934, puis Almosch et Wax (1939) et enfin Straffer, Shanb et Mitchell signalaient en Amérique du Nord les 9° 10° et 11° cas connus.

**SYMPTOMATOLOGIE.** — Le tableau clinique est caractérisé par une faible ascension thermique, assez irrégulière, une toux paroxystique précoce qui prend une allure chronique, une anémie constante et une hypertrophie notable du foie et de la rate. Au point de vue hématologique, la leucopénie est plus fréquente que la leucocytose (observée par Phelps, par Dodds, par Hansmann). La présence de grandes formes mononucléées dans le sang est habituellement constatée, ainsi d'ailleurs que la prolifération réticulo-endothéliale des organes révélée par l'examen histologique et qui montre de nombreux macrophages bourrés de parasites. Tous les cas observés ont été mortels.

Les malades étaient dans 3 cas des enfants de moins d'un an, des adultes, hommes ou femmes, dans les autres cas : toutes les races, blanche, noire et jaune ont été atteintes.

**PARASITOLOGIE.** — Comme nous l'avons indiqué, le parasite, pris pour un protozoaire par Darling et rapproché par Meloney du groupe des *Leishmania*, fut ensuite considéré



comme un champignon par Rocha Lima et d'abord identifié au *Cryptococcus farciminosus* (Rivolta).

Ota classe ce dernier dans le genre *Grubyella*, famille des Hyphomycètes (1925) ; Crumrine pense que le parasite de l'histoplasmose peut être distingué du *Cryptococcus farciminosus* et propose le nom de *Cryptococcus Darling* 1906, sur avis de Meleney d'abord partisan du rapprochement avec le parasite du kala-azar. Riley croit également qu'il s'agit de deux espèces voisines de *Grubyella* (comme *Leishmania donovani* et *L. tropica*).

Moore propose la dénomination de *Posodasia capsulata* (1934) et Almeida celle de *Torulopsis capsulata* (1933).

La tendance actuelle est de conserver au parasite le nom d'*Histoplasma capsulatum* donné par Darling et de le ranger dans le genre *Paracoccidioides* et la famille des *Paracoccidioidaceae* (Ciferri et Radaelli, 1936).

ISOLEMENT ET CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES. — La première culture fut obtenue par Dodd en prélevant aseptiquement des fragments de rate deux heures après la mort et en ensemençant largement sur divers milieux placés à l'étuve à 38° ou à la température du laboratoire. Sur gélose de Sabouraud la culture fut positive au bout de quinze jours à 25° (mycélium sans hyphes). Dans le bouillon glucosé à 37°, la culture se développe en trois semaines, donnant un mycélium et des formes levures. Sur gélose-sang la culture prend une teinte brun rougeâtre. Les formes mycéliennes poussent mieux à la température ordinaire et en milieu acide. Pour les auteurs américains qui ont étudié ce parasite, seules les formes levures représentent la forme pathogène tandis que les formes mycéliennes à spores constituent l'état saprophytique (hébergé par certains insectes ?).

Comparée à celle de l'*Histoplasma capsulatum*, la culture de *Cryptococcus farciminosus* serait plus lente, avec des hyphes aériens beaucoup plus courts, celui-ci donnerait sur gélose-sang un mycélium ramifié à segments courts, épais, terminés par des chlamydospores qui se détachent souvent dans les vieilles cultures.

Les formes levures ont 4 à 2  $\mu$  de diamètre, capsule non

comprise, l'épaisseur de celle-ci atteint  $1/4$  de l'axe le plus court. La fixation déforme le cytoplasme qui apparaît de contours irréguliers.

La fuchsine-vert de méthyle le colore en rouge brillant, mettant en évidence de fines vacuoles et un ou deux granules qui rappellent les noyaux des levures. Il n'a jamais été cons-

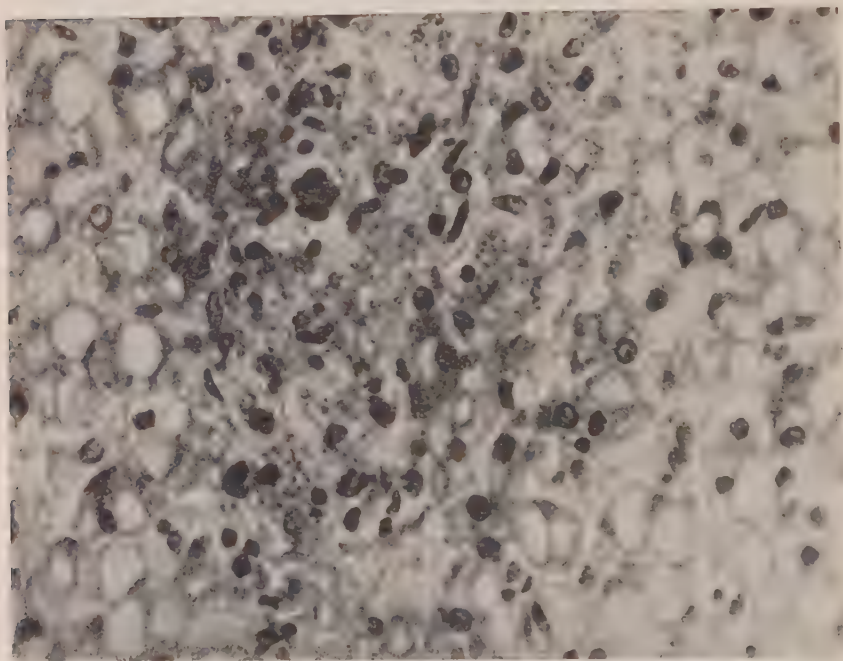


FIG. 1. — Photomicrographie de foie parasité par *Histoplasma capsulatum*. Les parasites sont contenus dans les éléments réticulo-endothéliaux groupés en nodules réactionnels au milieu des cellules hépatiques dont la surcharge graisseuse se manifeste par de larges vacuoles. Gross. : 450.

até de blépharoplaste et les formes flagellées que Darling avait cru voir n'ont pas été retrouvées.

REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LA MALADIE. — Les essais d'inoculation directe au cobaye pratiqués par Darling avaient été négatifs.

De Monbrun a reproduit la maladie chez les Rhesus avec

le champignon isolé du cas de Dodd : l'injection intraveineuse de 5 cent. cubes de suspension de culture de trois jours sur gélose-sang provoque un amaigrissement rapide de l'animal, de l'anémie, des adénopathies, de la diarrhée sanglante, de l'hépatosplénomégalie ; la mort survient au quatorzième jour. On trouve des parasites dans le sang et la

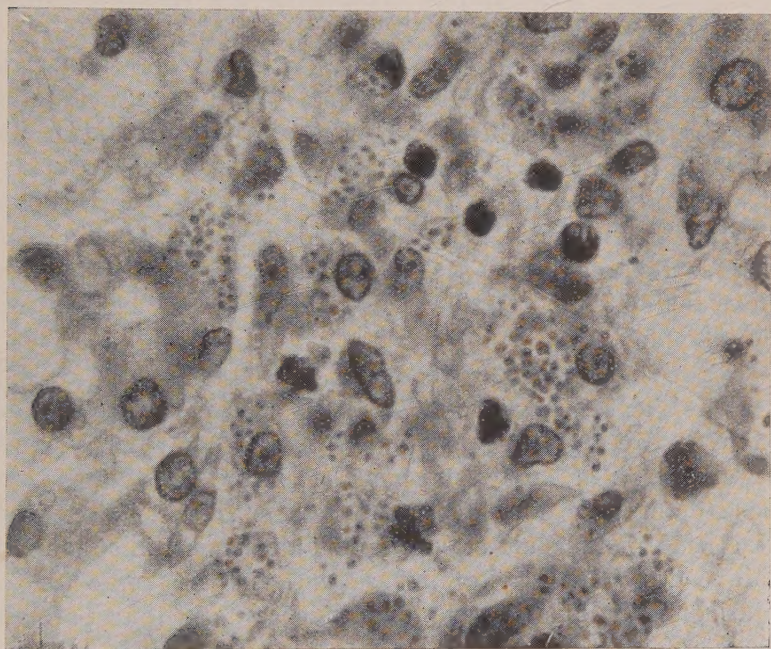


FIG. 2. — A un plus fort grossissement (650 diamètres) on voit nettement la disposition intracytoplasmique des parasites dans les cellules réticulo-endothéliales.

moelle osseuse ; ils sont particulièrement nombreux dans le foie et la rate.

Dans le cas publié par Hansmann, la souche isolée a permis à Radaelli d'inoculer le singe.

LÉSIONS HISTOPATHOLOGIQUES. — Elles sont surtout importantes au niveau du foie et de la rate, elles atteignent égale-



ment les ganglions, les poumons, l'intestin, ainsi que Darling l'avait déjà noté :

« Envahissement des cellules endothéliales des petits vaisseaux et des capillaires lymphatiques ou sanguins par un nombre énorme de micro-organismes encapsulés ; nécrose et cirrhose hépatiques, splénomégalie, pseudo-granulomes pulmonaires et intestinaux avec ulcérations du côlon, nécrose des ganglions lymphatiques tributaires des viscères congestionnés. »

Dans le foie que nous avons eu l'occasion d'examiner, la prolifération réticulo-endothéliale était très marquée, formant de gros nodules réactionnels bourrés de parasites intracellulaires au niveau des espaces conjonctifs légèrement sclérosés ; d'autres amas parasitaires sont également visibles dans les cellules de Kupffer. Les cellules hépatiques, à part une certaine surcharge graisseuse, ne présentent pas de modifications notables. La réaction leucocytaire est à peine marquée ou absente.

PORTE D'ENTRÉE. — Darling avait pensé que la maladie pouvait être transmise par un insecte hématophage ou se développer à la suite d'une contamination intestinale. Dans deux de ses cas, ainsi que dans ceux de Muller et de Crumrine, cette pathogénie est vraisemblable, mais l'infection primitive des voies respiratoires semble plus fréquente (6 cas) ainsi que l'indique le symptôme précoce de la toux paroxysmique.

Exceptionnellement, l'inoculation transcutanée serait possible (cas de Hansmann où une dermatite pustuleuse avec parasites fut observée).

En résumé, comme l'écrit Almosch, il s'agit d'une « maladie infectieuse rare d'origine mycosique » dont l'agent pathogène n'a pas encore une position taxonomique bien déterminée. En ce qui concerne l'épidémiologie et la pathogénie de l'histoplasmose, nos connaissances sont également incomplètes.



## BIBLIOGRAPHIE

- RIVOLTA et MICELLONE. *Giorn. d. anat. fisiol. e path. degli anim. dom.*, 1883.
- TOKISHIGA. *Centralbl. f. Bakt.*, **19**, 1896.
- DARLING (S. T.). *Arch. Inst. Med.*, 1908, p. 107-123 ; *J. Exper. Med.*, 1909, p. 515-531.
- NÈGRE (L.) et BRIDRÉ (J.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 14 juin 1911 ; *C. R. Acad. Sc.*, 18 avril et 17 mai 1910.
- DA ROCHA LIMA. *Centralbl. f. Bakt.*, **62**, 1912, p. 233.
- DARLING (S. T.). *J. Amer. Med. Assoc.*, **46**, 1916, p. 1283.
- BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Acad. Sc.*, 8 février 1918 ; *Ces Annales*, 1918 ; La lymphangite épizootique des solipèdes : *Monographie de l'Institut Pasteur*, Masson, Paris, 1920.
- OTA (M.). *Ann. parasit. hum. et comp.*, **3**, 1925, p. 71-78.
- PHELPS et MALLORY. *Unit. fruit Comp. Med. Dep<sup>t</sup>. ann<sup>l</sup>. rep.*, 1926, p. 115.
- RILEY (W.) et WATSON (J. C.). *Arch. Pathol.*, 1926, p. 662-667.
- WATSON (J. C.). *Fol. haematol.*, **37**, i, 1928, p. 70-93.
- CRUMRINE (R. M.) et RESSEL (J. F.). *Amer. J. trop. Med.*, **11**, 1931, p. 435-449.
- MULLER (H.). *Geneesk. Tijd. v. Nederl. Ind.*, **72**, 1931, p. 889-895.
- MOORE et MORRIS. *Ann. Missouri Bot. Gardon*, **19**, 1932, p. 397-428 ; *Ibid.*, **20**, 1932, p. 79-118.
- MOORE, MORRIS, MAC BRYDE et THOMPSON. *Arch. dermat. et syph.*, **27**, 1933, p. 49-69.
- DE MONBRUN. *Amer. J. trop. Med.*, **14**, 1934, p. 93-126.
- HANSMANN (G. H.) et SCHENKEN (J. R.). *Amer. J. Pathol.*, **10**, 1934, p. 731-738.
- DODDS (K.) et TOMKINS (E. H.). *Amer. J. Pathol.*, **14**, 1934, p. 128.
- CIFERRI et REDAELLI. *Boll. Sez. Ital. d. Soc. Int. di Microb.*, 1934 ; *Amer. J. trop. Med.*, 1934, p. 278 ; *Inst. Bot. Univ. Pavia*, **6**, 1935, A, XIII.
- MOORE. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 1934, p. 347.
- REDAELLI. *Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microb.*, 1935, p. 312-316.
- ALMOSCH (A. L.) et WAX (J. H.). *Amer. J. Pathol.*, juillet 1939, p. 477.

Le Gérant : G. MASSON.

